

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

**VLIV PODÁVÁNÍ ATORVASTATINU NA EXPRESI ENDOGLINU
V ATEROSKLEROTICKÝCH PLÁTECH**

**THE ATORVASTATIN EFFECT ON ENDOGLIN EXPRESSION IN
ATHEROSCLEROTIC PLAQUES**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:
Hradec Králové 2009

PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.
Soňa Trejbalová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

„Na tomto místě bych ráda poděkovala PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, konzultace a poskytování cenných rad při práci v laboratoři. Mé poděkování rovněž patří celému kolektivu Katedry biologických a lékařských věd za příjemné pracovní prostředí a všem mým blízkým za velkou podporu.“

Obsah

1. Úvod	9
2. Mikroskopická anatomie cév	12
2.1 Artérie	12
2.1.1 Arterioly	12
2.1.2 Artérie malého až středního typu	13
2.1.3 Velké artérie	14
2.2 Vény	14
2.2.1 Venuly	15
2.2.2 Vény malého až střední typu	15
2.2.3 Velké vény	15
2.3 Kapiláry	16
2.4 Prekapiláry a postkapiláry	17
2.5 Sinusoidy	17
3. Ateroskleróza a rizikové faktory	18
3.1 Ateroskleróza a zánět	18
3.1.1 Spouštěcí mechanismy zánětu	19
3.2 Patologie aterosklerotické léze	20
3.2.1 Časné léze	20
3.2.2 Fibrózní pláty	22
3.2.3 Komplikované léze	22
3.3 Klasifikace lézí dle American Heart Association	23
3.4 Rizikové faktory aterosklerózy	24
3.4.1 Ovlivnitelné rizikové faktory	25
3.4.1.1 Hyperlipoproteinémie	25
3.4.1.2 Kouření cigaret	25
3.4.1.3 Arteriální hypertenze	26
3.4.1.4 Diabetes mellitus	26
3.4.2 Neovlivnitelné rizikové faktory	26
4. Statiny	27
4.1 Mechanismus účinku	28
4.2 Nežádoucí účinky	29

4.3	Nelipidové účinky statinů	30
4.4	Rozdělení statinů.....	31
4.4.1	Atorvastatin.....	32
4.4.2	Simvastatin.....	32
4.4.3	Fluvastatin.....	33
4.4.4	Rosuvastatin.....	33
4.4.5	Pravastatin, Lovastatin, Pitavastatin	33
5.	Experimentální modely aterosklerózy	34
5.1	Hledání vhodného zvířecího modelu	34
5.2	Myší model aterosklerózy.....	35
5.2.1	Myší model C57BL/6	36
5.2.2	Myší model apoE/LDLr-DKO.....	37
6.	Transformující růstový faktor beta a endoglin.....	38
6.1	Transformující růstový faktor beta (TGF- β)	38
6.2	Endoglin.....	41
7.	Cíl práce.....	43
8.	Experimentální část	44
8.1	Zvířata a předepsaná dieta	44
8.2	Biochemická analýza	45
8.3	Imunohistochemie.....	45
8.4	Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí	47
8.5	Statistická analýza.....	48
9.	Výsledky.....	49
9.1	Biochemická analýza	49
9.2	Imunohistochemická analýza.....	50
9.3	Stereologická analýza endoteliální exprese endoglinu	53
10.	Diskuze.....	55
11.	Závěr	58
12.	Literatura	59

Abstrakt

Ateroskleróza je nenápadně se rozvíjející onemocnění cév, které však může mít i závažné následky a díky nim je řazeno mezi nejčastější příčiny úmrtí ve vyspělých zemích.

Statiny jsou nejvýznamnější a v dnešní době také nejpoužívanější hypolipidemika. Svými lipidovými i nelipidovými účinky prokazatelně snižují morbiditu i mortalitu ovlivněním aterosklerotického procesu.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit a popsat expresi endoglinu v aterosklerotických plátech u apoE/LDL-receptor deficientních myší. Dalším úkolem bylo kvantifikovat endoteliální expresi endoglinu v kořenu aorty po podání atorvastatinu.

K výzkumu byly použity myši kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem genů, jedním pro apolipoprotein E a druhým pro LDL receptor. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin. Atorvastatinové skupině byla podávána aterogenní dieta obohacená o 100 mg atorvastatinu na 1 kg váhy denně, kontrolní skupina dostávala pouze dietu aterogenní.

Biochemická analýza krve ApoE/LDLr-deficientních myší ukázala, že osmitýdenní podávání atorvastatinu signifikantně snížilo hladiny celkového cholesterolu i triacylglycerolů.

Imunohistochemická analýza prokázala expresi endoglinu u obou experimentálních skupin v kapilárách a drobných cévách myokardu, na cévním endotelu plátů i mimo léze, na semilunárních chlopních, naopak téměř nulová exprese byla detekována uvnitř aterosklerotických lézí.

Stereologická analýza ukázala na statisticky významně zvýšenou expresi endoglinu při podávání atorvastatinu v porovnání s kontrolní skupinou.

Tyto výsledky naznačují, že endoglin může být potenciálním cílem/markerem účinku atorvastatinu a zároveň by mohl mít vliv na vlastnosti cévního endotelu v průběhu aterogeneze.

Abstract

Atherosclerosis is an inconspicuously spreading disease which could cause serious ill effects due to them it is ranked among the most frequent causes of death in the technologically advanced world.

Statins are the most important and the most used lipid-lowering drugs nowadays. Thanks to their lipid and non-lipid effects they demonstrably lower the morbidity and mortality by affecting the atherosclerotic process.

The aim of this diploma thesis was to determine and describe the expression of endoglin in atherosclerotic plaques in apoE/LDL-receptor deficient mice. Moreover the endothelial expression of endoglin in the aortic root was quantified by means of immunohistochemistry and stereological methods.

We used apoE/LDL-receptor double deficient mice which is widely used animal model for the atherosclerotic research. ApoE/LDLr-deficient mice were subdivided into 2 groups. The control group of animals was fed with the western type diet. The same atherogenic diet was used in ATV group, where atorvastatin was added to the atherogenic diet at the dosage of 100 mg/kg per day.

The biochemical blood analysis of ApoE/LDLr-deficient mice manifested that the 8-week administration of atorvastatin significantly reduced the level of cholesterol and triacylglycerols.

The immunohistochemical analysis showed the expression of endoglin at both experimental groups in capillary vessels and small vessels of myocardium, at vascular endothelium of plaques also outside the lesions, at semilunar valves, on the contrary we detected hardly any expression inside the atherosclerotic lesions.

The stereological analysis showed significant increase of endothelial expression of endoglin after the atorvastatin treatment when compared with control group.

In conclusion we propose that endoglin could be both possible aim/marker of atorvastatin effect and it could affect the quality of vascular endothelium during atherogenesis.

1. ÚVOD

Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění, postihující v různé míře téměř každého z nás. Přitom ještě na počátku 19. století šlo o chorobu neznámou a badateli neprozkoumanou. Na vědeckém poli o ni vznikl obrovský zájem až během 20. století, stále však existuje mnoho otazníků a výzkumy probíhají ve velkém množství dodnes.

Jde o dlouhodobý proces, ve kterém dochází k zanášení a ucpávání cév. Původně se předpokládalo, že je aterosklerotický proces tvořen pouze akumulací tukových částic do tepenné stěny, později se však zjistilo, že se na vzniku lézí podílí spousta specifických molekulárních a buněčných reakcí, které lze v součtu nazvat jako zánětlivý proces. Přispívá k tomu fakt, že i přes moderní preparáty, které významně snižují hladinu lipidů v plazmě a výrazné změny v životním stylu, výskyt kardiovaskulárních onemocnění se nijak zásadně nesnížil a jsou stále nejčastější příčinou úmrtí ve Spojených státech, Evropě a velké části Asie.

Aterosklerotický proces si můžeme velmi zjednodušeně představit jako prosté zanášení vodovodního potrubí, ale s výrazným rozdílem, že mezi stěnou cév a krví dochází k neustálé buněčné komunikaci. Při jejím narušení se cévy stávají propustnějšími a aterosklerotická usazenina vzniká v jejím nitru, nikoli na povrchu. Lumen cévy se tak může zužovat, ale většinou ne tak výrazně, že by se stenózou krevní průtok výrazně snížil. Zásadní proces způsobující následné komplikace je tuhnutí plátů, ve kterých pak snadno vzniká fisura až ruptura, která iniciuje vznik trombu a tím náhlé uzavření přívodu krve do touto cévou zásobené oblasti.

Aterosklerotické léze se vyskytují hlavně ve velkých a středně velkých tepnách. V lidském těle můžeme poškození cév pozorovat během celého života, u kojenců a malých dětí většinou v podobě tukových proužků, které jsou ještě vratné (1).

Za nejdůležitější rizikový faktor se považuje zvýšený příjem cholesterolu v potravě, který se následně zabudovává do LDL (lipoproteinů s nízkou hustotou). Tyto částice jsou zodpovědné za ukládání cholesterolu do cév.

Bohužel na rozdíl od jiných nemocí, rozvoj aterosklerózy bez důkladnějších vyšetření nepoznáme. Závažnost nemoci zaznamenáme, až když dojde k výraznému omezení krevního průtoku. Komplikace jsou různorodé a vzhledem k rozsáhlosti cévního řečiště závisí na orgánu, do kterého je aterosklerotickou cévou přiváděna krev.

Mezi nejzávažnější projevy aterosklerózy patří ischemická choroba srdeční (ICHS). Srdeční sval je vyživován věnčitými tepnami, a pokud dojde k jeho sníženému zásobení kyslíkem a živinami, může se člověk dostat do přímého ohrožení života. K zužování tepny vyživující myokard však může docházet dlouhodobě a nepozorovaně. Rozsah postižení závisí na velikosti a průměru zasažené cévy. Pokud dojde pouze k chvilkovému nedokrvení, pacient pocítuje většinou výrazný tlak na hrudi a dušnost. Tento stav se označuje angina pectoris, je přechodný a po podání vazodilujícího nitroglycerinu nebo po zklidnění příznaky vymizí. Pokud je však plát nestabilní, může dojít k jeho ruptuře, tvorbě trombu a výraznému zúžení nebo úplnému uzavření lumen cévy. Nezásobená tkáň se hojí jizvou, stává se nefunkční a snižuje tak srdeční výkonnost. Zde se jedná o infarkt myokardu (IM), který bez včasného zásahu lékařů může vést ke smrti pacienta.

Na stejném principu jako ICHS vzniká i aterosklerotické postižení tepen mozku. Mozkové buňky jsou nedostatečně vyživovány, včetně paměťových, jejichž porucha má na svědomí častější zapomínání. Lidově nazývaná „skleróza“ je tedy mozková ateroskleróza. Náhlým uzávěrem tepny pak vzniká centrální mozková příhoda (CMP, mrtvice). Rozsah postižení je opět různý a závisí na velikosti postižené oblasti, změny mohou být i nevratné. Mezi nejčastější projevy patří ztráta vědomí, citlivosti některých částí těla, poruchy řeči, nehybnost anebo ztráta koordinace pohybu.

Nedostatečným prokrvováním dolních končetin vzniká také závažná ischemická choroba dolních končetin (ICHDK). Projevuje se obvykle klaudikačními bolestmi nohou, v pokročilejších fázích i klidovou bolestí. Končetiny jsou chladné, na postižených oblastech se ztrácí ochlupení a pacienty postihují často plísňové chodidel. Pokud dojde až k úplnému uzávěru tepny zásobující končetinu, dochází k místnímu odumírání tkání, které pak mohou být napadeny infekcí. Vzniká gangréna, jejíž jedinou možností léčby je amputace.

Nemoci oběhové soustavy jsou stále nejčastější příčinu úmrtí nejen v České republice, ale i v dalších vyspělých státech. Ve velké většině je ateroskleróza jejich příčinou, proto je důležité nadále studovat děje v aterogenním procesu, snažit se objasnit působení všech rizikových faktorů a zdokonalovat léčbu.

<i>Příčiny úmrtí</i>	nemoci oběhové s.	zhoubné novotvary	vnější příčiny	nemoci dýchací s.	nemoci trávicí s.	ostatní
ŽENY (%)	55,7	23,5	3,6	5,0	3,9	8,3
MUŽI (%)	44,7	28,8	8,0	5,9	5,1	7,5

Tab. 1 – Struktura zemřelých podle příčin za rok 2007 (Zdroj: www.uzis.cz)

2. MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

Základní funkcí cév je zajišťovat krevní oběh. Krev je přiváděna přes vena cava superior a inferior do pravé srdeční předsíně, přechází přes trojcípou chlopeň do pravé komory a potom se dostává do plicního oběhu skrz truncus pulmonalis. V plicních kapilárách se krev okysličuje a zbavuje oxidu uhelnatého. Zpět do srdeční levé předsíně je přiváděna plicními vénami, odkud je vytlačována přes dvojčípou chlopeň do levé komory. Následně je krev pumpována přes aortu do celého těla, kde zásobí kyslíkem orgány (2).

Základní vrstvy krevních cév:

1. tunica intima (interna) – nejbliže k lumen
2. tunica media
3. tunica adventitia (externa) – nejdále od lumen

2.1 Artérie

Základním charakteristickým znakem všech artérií je dominující tunica media. Můžeme je rozlišovat podle velikosti na nejmenší - arterioly, větší - arterioly malého až středního typu a největší - artérie velkého kalibru.

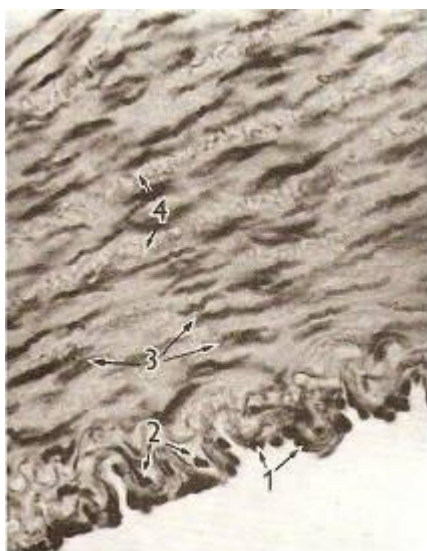
2.1.1 Arterioly

Arterioly pomocí své kontrakce či dilatace kontrolují krevní průtok v příslušných úsecích cévního systému. Souvisí to s poměrně tlustou stěnou a užším lumen. Jejich průměr je v rozmezí okolo 50-300 μm .

Nejsilnější vrstvou je tunica media, která je složena z jedné až pěti vrstev hladkosvalových buněk. Tenčí tunica adventitia je tvořena vazivovou fibroelastickou vrstvou. Nejslabší vrstvu (tunica intima) tvoří elastická membrána (membrana elastica interna) a endotel, který dosedá na malé množství subendotelového vaziva.

2.1.2 Artérie malého až středního typu

Artérie malého a středního typu rovněž regulují přísun krve do určité orgánové oblasti a to dle aktuální potřeby. Tato skupina se někdy nazývá taky artérie svalového typu. Je to dáno bohatým zastoupením buněk hladkého svalstva v tunica media, což přispívá k tloušťce stěny (3).



Obr. 1 – Lidská artérie svalového typu. 1 – endotel, 2 – membrana elastica interna, 3 – hladkosvalové buňky v tunica media, 4 – jemná elastická vlákna. Celoidinový řez, zvětšeno 300x. (2).

Tunica intima se od předchozího typu liší v bohatší subendotelové vrstvě s kolagenními a elastickými vlákny, nacházejí se zde i fibroblasty. Membrana elastica interna se může dělit u starších jedinců na více elastických lamel, je silnější a obsahuje charakteristické fenestrace. Tunica media je silná a tvoří ji až 40 vrstev hladkosvalových buněk. Může obsahovat menší množství vláken kolagenních, retikulárních, výjimečně i

fibroblasty. Počet elastických vláken je různý, četnější u větších artérií. Tunica adventitia je tvořena řídkým kolagenním vazivem. Na rozhraní mezi tunica media a tunica adventitia se tvoří z elastických vláken membrana elastica externa.

2.1.3 Velké artérie

Mezi velké arterie patří např. aorta a truncus pulmonalis. Nazývají se někdy jako artérie elastického typu, protože obsahují vysoké množství elastinu. Díky němu je céva nažloutlá. Lumen těchto arterií je široké a stěna vůči němu tenká.

Tunica intima aorty dospělého člověka dosahuje tloušťky až 100 μm . Endotel je tvořen buňkami polygonálního tvaru, které dosedají na subendoteliální vrstvu tvořenou kolagenními fibrilami, fibroblasty a elastickými vlákny. Tato vlákna ve vnější vrstvě prostupují do tunica media. Nejtlustší stěnou je tunica media. Velké množství oploštělých hladkých svalových buněk se váže na elastické blanky, kterých je v této vrstvě 40-60, jsou dírkované a přibližně 2,5 μm silné. Mezi blankami je také amorfni hmota, fibroblasty a kolagenní fibrily. Vazivově elastická tunica adventitia je tenčí, její hlavní úlohou je bránit nadměrnému roztažení vnitřních vrstev při systole. Obsahuje nervová vlákna a vlastní výživné cévy (vasa vasorum) (2).

2.2 Vény

Cestu artérií obvykle sledují vény. Mají tenčí stěnu, jejich objem je asi třikrát větší, tím se zvyšuje i jejich kapacita. Regionální rozdíly zásobení vénami jsou daleko větší než u artérií. Rozdělují se podle velikosti na malé – venuly, větší – vény malého až středního typu a na velké vény.

2.2.1 Venuly

Tunica intima je u venul tvořena tenkou subendotelovou vazivovou vrstvou a endotelem. Tunica media je v porovnání s artériemi tenká, obsahuje minimum elastických vláken a tvoří ji zpravidla jedna až tři vrstvy hladkosvalových buněk. Tunica adventitia je složena ze silnější vrstvy kolagenních vláken. Průsvit venul bývá v rozmezí 0,2-1 mm.

2.2.2 Vény malého až střední typu

V tunica intima najdeme polygonální endotelové buňky a jemnou subendotelovou vrstvou. Na hranici s tunica media je různé množství elastických vláken, ze kterých se může tvořit hustá síť. Tunica media je opět tenčí, nejlépe je vyvinuta v dolních končetinách. Obsahuje síť elastických vláken, v nichž se nacházejí svazečky hladkosvalových buněk a kolagenní vlákna. Fibroelastická tunica adventitia je silná, často se v ní směrem k tunica media vyskytují svalové buňky v longitudinálním uspořádání. Průsvit těchto vén se pohybuje v rozmezí 1-9 mm.

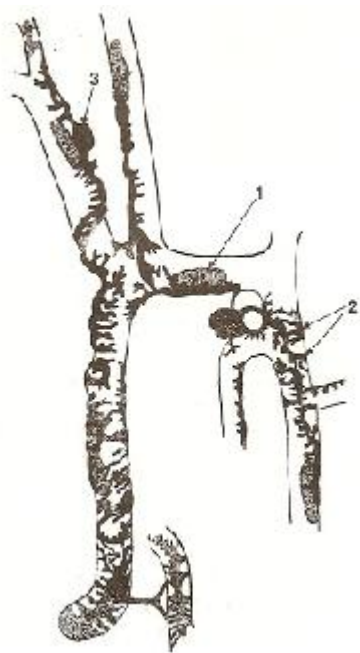
2.2.3 Velké vény

Tunica intima se od předchozího typu liší tlustší subendotelovou vrstvou. V jejím prostoru se někdy nacházejí rozptýlené hladkosvalové buňky a tvořit se může i slabší membrana elastica interna. Tenká tunica media je hlavně vazivově elastického typu, hladká svalovina je výrazně redukována, případně úplně chybí. Tunica adventitia je nejvýraznější vrstvou, obsahuje velké množství buněk hladké svaloviny.

2.3 Kapiláry

Nejjednodušší cévní strukturu vykazují kapiláry. Krevní kapiláry jsou spojkou mezi arteriálním a venózním řečištěm. Hustota kapilární sítě závisí na intenzitě látkových přeměn orgánů, vyšší hustotu můžeme pozorovat např. v ledvinách, kosterním svalu a plicích, řidší sítě jsou např. ve šlachách a hladké svalovině. Pro látkovou výměnu je výhodná jejich slabá stěna a pomalý průtok krve.

Průměr kapilár se pohybuje kolem 7 μm a mají tvar jednoduchých trubic pokrytých endotelovými buňkami s plochými jádry. V těch nejmenších může úplnou výstelku tvořit dokonce jediná endotelová buňka. V závislosti na aktivitě orgánu se mění průsvit kapilár, při nečinnosti jsou kolabovány a při funkčním stavu se naplňují krví. Za kontraktilní schopnost kapilár jsou zodpovědné pericyty, což jsou buňky s dlouhými výběžky obklopující jejich stěnu (viz obr. 2).



Obr. 2 - Pericyt . 1 - jádro endotelu, 2 - rozvětvené výběžky pericytu, 3 - jádro pericytu (2).

Kapiláry mohou mít buď souvislou endotelovou výstelku, nebo endotel fenestrovaný, s mikroskopickými otvůrkami. V cytoplazmě se nacházejí mikropinocytární vezikuly. Endotel se svou proliferační schopností podílí na hojících procesech, a také zabraňuje srážení krve, pokud je nepoškozený.

2.4 Prekapiláry a postkapiláry

Lumen prekapilár je široké v rozmezí 12-40 μm a v kapilárním řečišti se nacházejí na arteriální straně. Ty nejmenší se skládají z trubice pokryté endotelem a malým počtem hladkých svalových buněk. Lumen postkapilár dosahuje hodnot kolem 200 μm . Jsou značně prostupné a tvoří je kromě endotelu i roztroušené elementy vazivové tkáně. Nacházejí se na venózní straně kapilárního řečiště.

2.5 Sinusoidy

Sinusoidy mohou být spojkami mezi arteriolou a venulou, ale i mezi dvěma venulami. Jejich struktura je od kapilár odlišná, rozdíl nacházíme hlavně v četných fenestracích endotelových buněk. Průsvit může dosahovat až 30 μm (2).

3. ATEROSKLERÓZA A RIZIKOVÉ FAKTORY

Ateroskleróza je považována za jeden z největších zdravotních problémů dnešní doby, její výzkum se stále prohlubuje a teorie zdokonalují, ovšem otazníků kolem buněčných a molekulárních pochodů při aterogenezi, diagnostiky, léčby i rizikových faktorů je pořád velká spousta (1).

Aterosklerotický proces není jen fenoménem moderní civilizace, kornatění tepen bylo prokázáno už na mumiích z období 15. století před Kristem. Postižení karotid i s kalcifikacemi dále například odhalilo CT vyšetření u zachovalého mužského těla, nalezeného v ledovcovém masívu v Jižním Tyrolsku.

Název ateroskleróza vznikl z řeckého slova „athera“, neboli ovesná kaše a latinského „skleros“, což znamená tvrdý. Jedním z prvních, kdo se začal podrobněji zabývat aterosklerotickými změnami, byl Michelangelo.

Ateroskleróza byla velmi dlouho považována za mechanický děj, který se vyznačoval pouze ukládáním tuků a kalcia do cév. V současnosti je aterosklerotický proces vnímán jako odpověď organismu na poškození intimy, projevující se zánětlivou reakcí (4).

3.1 Ateroskleróza a zánět

Vztah aterosklerózy a zánětu je určitě jednou z největších kapitol současného výzkumu. Zdá se, že zánět podporuje i rozvoj akutního koronárního syndromu, jehož příčinou je vazokonstrikce a trombóza v místě aterosklerotické léze. Tento syndrom provázejí zvýšené hodnoty cirkulujících markerů zánětu, CRP, sérového amyloidu A, interleukinu 6 a dalších.

Projevy zánětu můžeme sledovat během celé doby aterogeneze. Při zjišťování prognózy nemocného člověka je snaha využít zánětlivých markerů, jako ukazatelů

zvyšujícího se rizika. Spojitost byla prokázána již pro několik cytokinů a reaktantů akutní fáze (1).

3.1.1 Spouštěcí mechanismy zánětu

Mezi spouštěcí mechanismy zánětu patří:

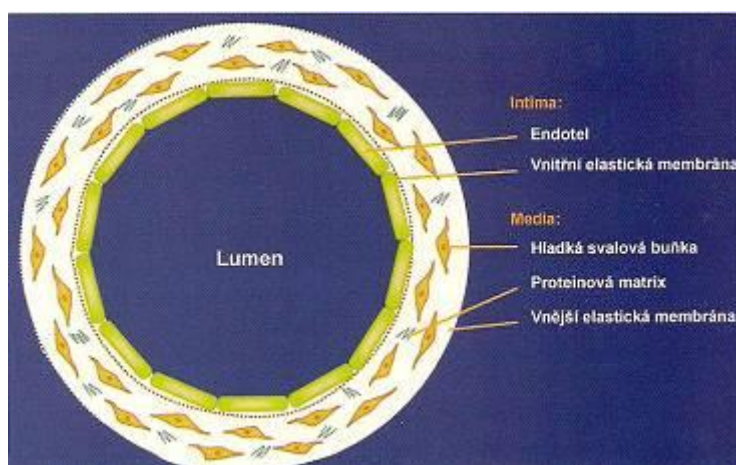
- **Oxidované lipoproteiny** – Za významné spouštěče jsou považovány hlavně oxidativně modifikované lipoproteiny o nízké hustotě (LDL), které jsou navázané na proteoglykany v cévní intimě. Tyto částice indukují v buňkách cévní stěny a v makrofázích expresi cytokinů, adhezních molekul a dalších mediátorů zánětu. Oxidativně modifikované mohou být i lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL) a intermediární lipoproteiny (IDL), u těchto částic se však předpokládá, že jsou schopny samy aktivovat zánět v endoteliálních buňkách (5).
- **Hypertenze** – Mezi aterosklerózou a hypertenzí existuje pravděpodobně oboustranný vztah. Na rozvoji hypertenze se totiž může spolu účastnit zánět a naopak angiotenzin II zvyšuje prozánětlivé cytokiny interleukin 6 a VCAM-1 (6).
- **Diabetes** – Glykované makromolekuly, které vznikly na podkladě hyperglykémie, jsou zodpovědné za zvýšenou produkci cytokinů v buňkách endotelu (6).
- **Obezita** – Obezita je sama osobně nebezpečná vlastní tvorbou cytokinů v tukové tkáni, navíc je také predispozičním faktorem pro vznik dalších onemocnění, podporujících rozvoj aterosklerózy, jako je diabetes, inzulinová rezistence, nebo různé dyslipidémie (7).
- **Infekce** – Ateroskleróza se vyvíjí i bez přítomnosti infekce, ale ukázalo se, že některé mikroorganismy, jako jsou Herpes simplex virus, Chlamydia pneumoniae či Helicobacter pylori, jsou schopné, za ne zcela objasněných okolností, vaskulární riziko zvýšit (8).

3.2 Patologie aterosklerotické léze

Výskyt aterosklerotických lézí je vázán na specifická místa, nejvíce se vyskytují na středních a velkých artériích. Mezi nejčastěji postižené tepny patří koronární artérie (hlavně ramus interventrikularis anterior), hrudní aorta, arteria poplitea, vnitřní karotické artérie a tepny Willisova okruhu (9).

Rozlišujeme 3 základní formy aterosklerózy:

1. Časné léze (tukové proužky)
2. Fibrózní pláty (ateromy)
3. Komplikované léze



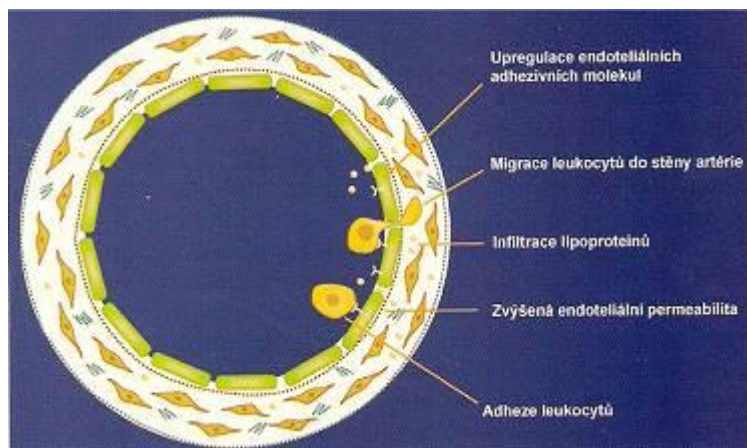
Obr. 3 – Průřez zdravou artérií (Češka et al, 2005)

3.2.1 Časné léze

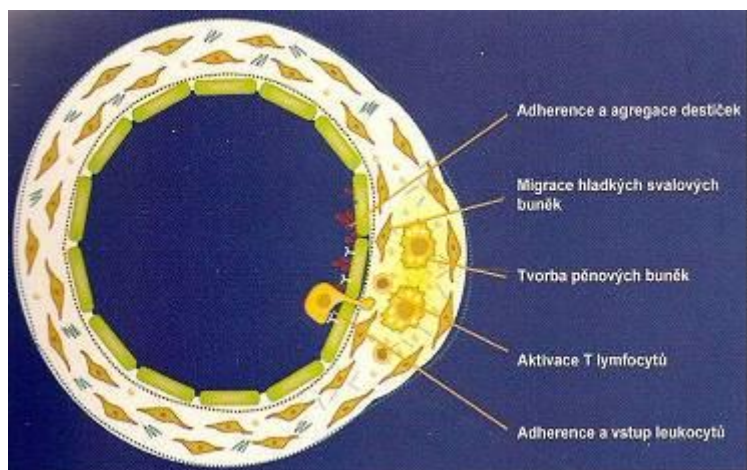
Hlavním projevem časných lézí jsou tukové proužky (fatty streaks). Pravděpodobně jsou přítomné u všech jedinců, často již od novorozeneckého věku. Jsou nejčastější formou aterosklerózy, mohou se dále vyvíjet, rozšiřovat se, ale i zanikat. Tyto léze se vyznačují žlutou barvou a nacházejí se majoritně v intimě velkých cév. Nezasahují do cévního lumen, proto je nepravděpodobné, že by významně ohrozily krevní průtok (10).

Tukové proužky jsou složeny v menší míře z T-lymfocytů (CD4, CD8) a hlavně z pěnových buněk, které mohou vzniknout dvěma cestami:

- Z monocytů se tvoří makrofágy, které jsou přitahovány do cévní stěny, kde pohlcují molekuly cholesterolu, uvolněné z lipoproteinových částic.
- Z hladkosvalových buněk, které se přesunují z medie do intimy, ve kterých se pak opět hromadí estery cholesterolu.



Obr. 4 – Iničiační fáze aterosklerózy (Češka et al, 2005)

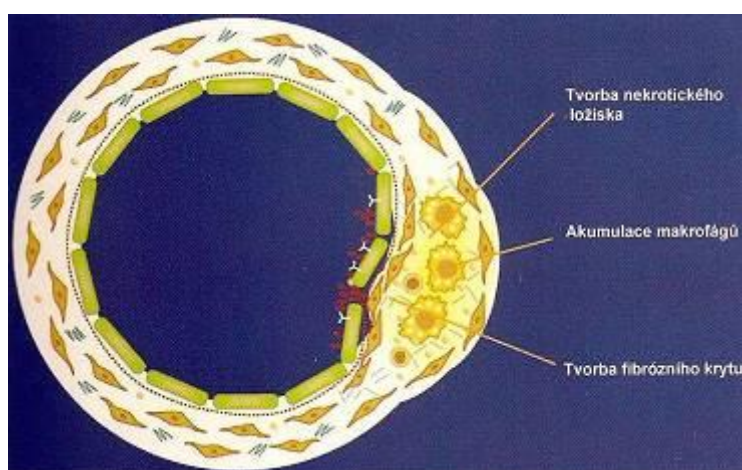


Obr. 5 – Tvorba tukového proužků (Češka et al, 2005)

3.2.2 Fibrózní pláty

Druhou a mnohem nebezpečnější formou aterosklerotického procesu je tvorba fibrózních plátů. Ve stěně cév je můžeme pozorovat jako tužší, ostře ohraničená ložiska, šedavé až žluté barvy. Jsou podstatně větší než tukové proužky, rozšiřují cévní stěnu směrem do lumina, a tím mohou způsobit jeho částečnou nebo až úplnou obstrukci.

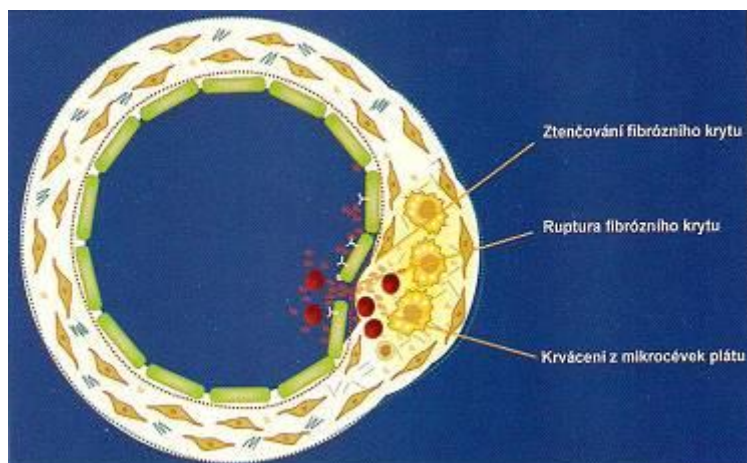
Nacházejí se v nich stejné buněčné elementy jako v časných lézích, avšak ve větším množství a s vakuolami hojně přeplněnými tukem. Lymfocyty se v ateromech vyskytují také. Kromě již zmiňovaných buněk fibrózní plát tvoří kolagenní matrix s volnými tukovými částicemi. Takto rozšířené pláty mohou nekrotizovat a posléze vápenatět (11).



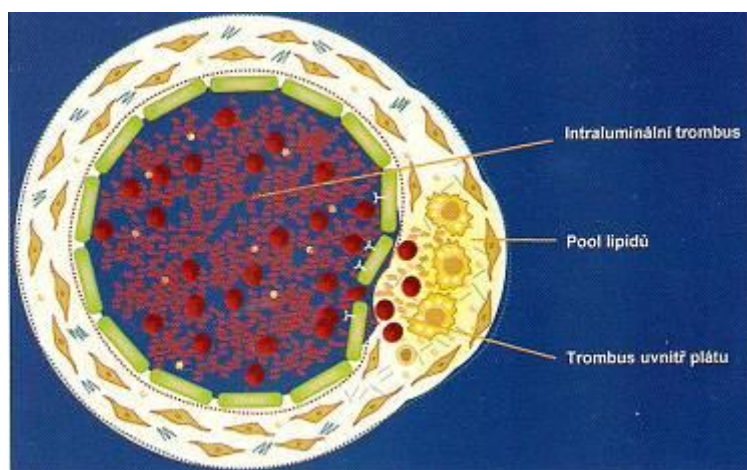
Obr. 6 – Tvorba fibrózního plátu (Češka et al, 2005)

3.2.3 Komplikované léze

Komplikované léze jsou důsledkem výrazné kalcifikace a ruptur fibrózních plátů. V trhlinách dochází ke krvácení z postižených mikrocév. Následuje agregace trombocytů, které zapříčiňují vznik trombu, jež může člověka bezprostředně ohrozit na životě (11).



Obr. 7 – Ruptura fibrózního plátu (Češka et al, 2005)



Obr. 8 – Vznik trombu (Češka et al, 2005)

3.3 Klasifikace lézí dle American Heart Association

Jde o podrobnější a využívanější klasifikaci, rozděluje aterosklerotické léze do 6 typů, přičemž první 3 fáze jsou prekurzorové, většinou klinicky němé, další 3 fáze jsou rozvinuté a mohou zapříčinit vznik trombu (12).

- **Typ I** – Pouze mikroskopicky a chemicky detekovatelné izolované pěnové buňky.

- **Typ II** – Okem viditelné tukové proužky. Lipidy jsou umístěny většinou intracelulárně.
- **Typ III** – Pro tento typ jsou typická menší či větší depozita tuků v extracelulárním prostoru, ještě se však netvoří lipidové jádro. Tukové částice mohou deformovat všechny vrstvy cévní stěny (13).
- **Typ IV** – Lézi tvoří tuhé lipidové jádro, obklopené pěnovými buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami.
- **Typ V** – Tyto léze obsahují velké množství pojivové tkáně.
- **Typ VI** – Nejzávažnější, komplikované léze předchozích typů. Projevují se rupturami, hematomy, hemoragiemi či trombózou, někdy i v kombinacích (12).

Nomenklatura a histologie	Typy lézí	Hlavní mechanismy růstu	Přechodný nástup	Klinická korelace	
Typ I (iniciální): izolované pěnové buňky z makrofágů	<pre>graph TD; I((I)) --> II((II)); II --> III((III)); III --> IV((IV)); IV --> V((V)); V --> VI((VI)); VI --> IV;</pre>	akumulace tuků	první dekáda	Klinicky němé	
Typ II (tukové proužky): intracelulární akumulace lipidů			třetí dekáda		
Typ III (přechodné): změny typické pro typ II, malá extracelulární depozita tuků					
Typ IV (aterom): změny typické pro typ II, extracelulární lipidové jádro		nárůst hladké svaloviny a kolagenu	čtvrtá dekáda	Klinicky němé nebo manifestní	
Typ V (fibroaterom): lipidové jádro a pojivová vrstva, nebo vícenásobná lipidová jádra a pojivové vrstvy, nebo převážně kalcifikace, nebo převážně pojivo					
Typ VI (komplikované): defekt povrchu, hematom - hemoragie, trombus		trombóza, hematom			

Obr. 9 – Rozdělení aterosklerotických lézí dle American Heart Association (Češka et al, 2005)

3.4 Rizikové faktory aterosklerózy

Rizikových faktorů, které podporují rozvoj aterosklerotického procesu, je velké množství a jistě jich ještě mnoho nebylo objeveno. Při znalosti těchto charakteristik lze vývoj choroby předpokládat a je samozřejmě nejlepší, pokud je to možné, riziko progresu aterosklerózy snižovat, ať už farmakologicky, nebo změnou životního stylu. Efekt těchto faktorů se totiž u jedince nesčítá, ale násobí.

3.4.1 Ovlivnitelné rizikové faktory

Některé z těchto faktorů je možné zcela eliminovat. U jiných je možné snížit jejich negativní působení pomocí vhodné farmakologické léčby, nebo změnou životosprávy. Mezi nejdůležitější patří porucha metabolismu lipidů (hyperlipoproteinémie), kouření, arteriální hypertenze a diabetes mellitus. Mezi další patří např. obezita, nízká fyzická aktivita, zvýšená srážlivost krve (vysoká hladina fibrinogenu) a zvýšená hodnota homocysteinu (14).

3.4.1.1 Hyperlipoproteinémie

Z hlediska rozvoje aterosklerózy je nejdůležitější LDL-cholesterol. Vysoce riziková je hodnota nad 4,1 mmol/l, za hraniční se považuje rozmezí 3,4-4,1 mmol/l. Při manifestaci onemocnění je však nutné tuto hranici ještě snížit. Hodnota celkového cholesterolu by neměla překročit 5,0 mmol/l.

Neméně významná je i hodnota HDL-cholesterolu, která by neměla být nižší než 1,0 mmol/l. HDL-cholesterol zajišťuje reverzní transport cholesterolu (z periferie do jater), má i antioxidační působení a působí protizánětlivě. Vyšší riziko aterosklerózy způsobuje i snížení koncentrace apolipoproteinu A-I či zvýšení hladiny apolipoproteinu B (15).

3.4.1.2 Kouření cigaret

Zanechání kouření již v brzké době podstatně snižuje riziko rozvoje ischemické choroby srdeční a dalších kardiovaskulárních komplikací. Předpokládá se, že kouření dýmky a doutníků riziko nezvyšuje, může se však podílet na vzniku jiných závažných onemocnění (16).

3.4.1.3 Arteriální hypertenze

Zvýšený krevní tlak je považován za jeden z nejvýznamnějších rizikových faktorů. Hraniční hodnota je 140/90 mm Hg, u diabetiků klesá na 130/85 mm Hg. Léčba antihypertenzivy prokazatelně snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních chorob (17).

3.4.1.4 Diabetes mellitus

Při tomto onemocnění se ateroskleróza manifestuje již v nižším věku a má závažnější průběh. Je proto důležité diabetiky včas odhalovat a účinně léčit (18).

3.4.2 Neovlivnitelné rizikové faktory

Neovlivnitelné rizikové faktory nemůžeme v současné době nijak měnit, jsou nám dané už od narození. Asi nejdůležitějším se jeví věk jedince. U mužů se zvyšuje pravděpodobnost manifestace aterosklerózy po 45. roce a u žen po 55. roce života, přičemž už žen se hranice snižuje proběhlou menopauzou, bez následné medikamentózní estrogenní substituce (19).

Estrogeny se podílí na zvyšování protektivního HDL-cholesterolu. Vzhledem k tomu, že jsou v dostatečném množství pouze u žen produktivního věku, můžeme mužské pohlaví považovat za další významný rizikový faktor (20).

Neméně důležité jsou genetické faktory, které se projevují v rodinné anamnéze. Klinické formy ischemické choroby srdeční u rodičů a příbuzných prvního stupně v nižším věku mohou tedy poukazovat na předčasný rozvoj aterosklerózy.

4. STATINY

Statiny patří mezi hypolipidemika, jejichž cílem je snížení kardiovaskulární morbidity a mortality ovlivněním aterosklerotického procesu. Dosahují toho hlavně zásahem do lipidového spektra, ale využívají se i jejich nelipidové účinky. Právě statiny mají nejvíce důkazů o účinku a prokazatelně snižují zdravotní riziko vyplývající z rozvíjející se aterosklerózy.

Z dosavadních studií lze odhadnout míru ovlivnění jednotlivých lipidových složek. Záleží ovšem jak na velikosti dávky statinů, tak i na délce léčby. Snížení hladiny celkového cholesterolu se pohybuje v rozmezí 25-30 %, hodnoty LDL-cholesterolu klesají o 25-40% a triglyceridy se snižují o 5-20 %. Zároveň dochází k mírnému zvýšení hladiny protektivního HDL-cholesterolu přibližně o 5-10 %. Těmto odhadům odpovídá i mírný vzestup hladiny apolipoproteinu A-I a výrazné snížení apolipoproteinu B. Hodnoty těchto apolipoproteinů jsou navíc přesnějšími markery rizika předčasného vzniku ischemické choroby srdeční (21).

Statiny jsou užívány převážně při léčbě izolované hypercholesterolémie, ale uplatňují se terapeuticky i u smíšené hyperlipoproteinémie. Snižování triacylglycerolů není tak markantní. Výrazněji je tato schopnost vyjádřena zejména u atorvastatinu, který jejich hladinu snižuje při běžných dávkách o asi 20 %, při dávce 80 mg, která se prakticky nepoužívá, dokáže snížit koncentraci triglyceridů o více než 40%.

Léčiva z této skupiny se užívají jak v monoterapii, tak v kombinované léčbě. U smíšených hyperlipidemií se čím dál více dává přednost kombinaci s fibráty. Další spojení statinů může být i s niacinem. Při terapii izolované hypercholesterolémie se dlouho preferovalo spolužívání se seskvestranty žlučových kyselin, nyní se dostává do popředí kombinace s ezetimibem. Ezetimib inhibuje intestinální absorpci cholesterolu (22).

Charakteristika	atorvastatin	rosuvastatin	fluvastatin	lovastatin	pravastatin	simvastatin
max. dávka (mg/den)	80	80	80	40	40	80
dopor. dávka (mg/den)	10-20	5-20	20-80	20-40	20-40	10-40
t _{1/2} (h)	14	20	1,2	3-15	1-2	1-2
doba podávání	večer	večer	večer	večer s jídlem	večer před jídlem	večer
renální exkrece (%)	2	10	> 6	10	50	13
jaterní metabolismus	CYP450 3A4	desmethylace	CYP450 2C9	CYP450 3A4	sulfatace	CYP450 3A4

Tab. 2 – Základní charakteristika statinů. Převzato z internetových stránek:
https://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141_17963.html

4.1 Mechanismus účinku

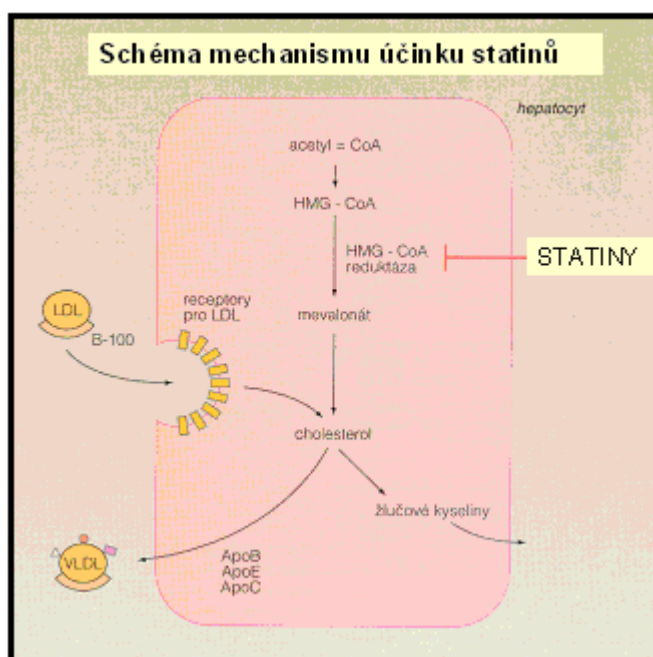
Statiny jsou kompetitivní inhibitory 3-HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzymu A) reduktázy. Tento enzym je zásadní pro vznik sterolů včetně cholesterolu. Katalyzuje přeměnu 3-HMG-CoA na kyselinu mevalonovou, což je jeden z prvních mezistupňů biosyntézy cholesterolu (23).

Pokud buňka zaznamená sníženou syntézu cholesterolu, dojde ke zvýšené expresi LDL receptorů na buněčné membráně hepatocytů, ale i na buňkách dalších orgánů. Díky tomu se lipoproteinové částice s nízkou hustotou vychytávají z krevního oběhu rychleji a účinněji se odbourávají.

Mechanismus snižování hladin triglyceridů není zatím dostatečně objasněn. Uvažují se dvě možnosti:

- Inhibice syntézy VLDL částic v játrech
- Vychytávání také přes LDL receptor, na které se partikule VLDL vážou přes apolipoprotein E

Hlavním účinkem statinů zůstává snížení hladiny LDL, čímž samozřejmě klesá i množství celkového cholesterolu (23).



Obr. 10 – Mechanismus účinku statinů. Převzato z internetových stránek:
www.lf3.cuni.cz/farmakologie/hypolipidemika_fyzioterapie.ppt

4.2 Nežádoucí účinky

Ačkoli je v poslední době bezpečnost statinů často zpochybňována, můžeme je zařadit mezi dobře snášená léčiva s minimálním množstvím nežádoucích účinků. Mezi ty spíše nepříjemné a méně nebezpečné patří např. bolesti hlavy, exantém, insomnie, zácpa, dyspepsie nebo pruritus. Vyskytují se ale jen zřídka.

S ohledem na to, že je cholesterol pro organismus nepostradatelný (je základní složkou buněčných membrán a vznikají z něj různé steroidní hormony, nebo také žlučové

kyseliny), sledovaly se funkce na něm závislé, ale žádná porucha těchto funkcí nebyla prokázána.

Nejzávažnějším nežádoucím účinkem je rhabdomyolýza, která může skončit smrtí pacienta. Hlavním zdrojem obav se stala aféra okolo cerivastatinu, který jak v monoterapii, tak v kombinaci s gemfibrozilem zavinil fatální rhabdomyolýzu u většího množství léčených osob. Z tohoto důvodu byl stažen kromě Japonska z celosvětového trhu. Riziko není jen u cerivastatinu, ale u všech statinů, i když v podstatně menším množství. Rovněž byl vysoký počet případů zaznamenán u simvastatinu, ale vzhledem k tomu, že byl dlouhá léta nejpredepisovanějším statinem, je jeho bezpečnost vzhledem k cerivastatinu mnohem přijatelnější (24).

Nebezpečí rhabdomyolýzy mnohonásobně zvyšují interakce, kterých je nutné se vyvarovat. Statiny se biotransformují v játrech přes izoenzymy cytochromu P 450. Pokud jsou tyto izoenzymy inhibovány, dochází ke sníženému odbourávání statinů a jejich nadměrné kumulaci. Koncentrace se může zvýšit až 20x. Inhibici izoenzymů cytochromu P 450 mohou způsobovat např. antimykotika ketokonazol nebo itrakonazol, azalidová a makrolidová antibiotika a cyklosporin. Jedná se především o kompetitivní inhibitory izoenzymu 3A4, kterým je metabolizována většina statinů. V úvahu by měly být brány i možné interakce s dalšími substráty tohoto izoenzymu, např. felodipinem, diltiazemem, antikoncepčními přípravky s ethisteronem a dalšími.

Potvrzený účinek statinů snižující morbiditu a mortalitu na aterosklerotické komplikace však mnohonásobně převyšuje potenciální riziko rhabdomyolýzy. Léčba je téměř maximálně bezpečná, pokud je monitorovaná (25).

4.3 Nelipidové účinky statinů

Účinky statinů, které nezpůsobují ovlivnění koncentrace lipidů, také napomáhají léčbě aterosklerózy. Některé z nich jsou však způsobeny nepřímo, vlivem snížené hladiny především cholesterolu (26).

- Na zlepšení endoteliálních funkcí mají vliv všechny statiny. Tento účinek lze vysvětlit nižší koncentrací lipidů, efekt se přičítá ale i omezeným dosedáním adhezních molekul na endotel.
- Stabilizace aterosklerotických plátů je dalším spíše nepřímým lipidovým účinkem.
- Antiagregační působení je typicky nelipidovým efektem statinů. Můžeme jej pozorovat hlavně u pravastatinu.
- Proliferace hladkých svalových buněk v cévní stěně je dalším typicky nelipidovým účinkem, vyjádřen je nejvíce u simvastatinu, fluvastatinu a lovastatinu.

4.4 Rozdělení statinů

Statiny můžeme rozřazovat podle mnoha hledisek. Asi nejběžnější je dělení podle rozpustnosti ve vodě či tucích a podle původu (27).

Rozdělení statinů podle lipofility/hydrofility:

- Lipofilní – simvastatin, lovastatin, atorvastatin
- Hydrofilní – pravastatin, fluvastatin, rosuvastatin

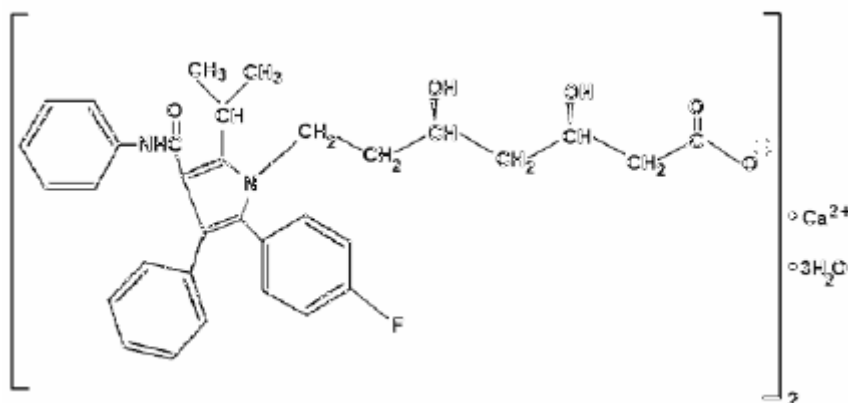
Rozdělení podle původu:

- I. generace (produkty plísní) – simvastatin, lovastatin, pravastatin
- II. generace (semisyntetické) – fluvastatin
- III. generace (syntetické) – atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin

4.4.1 Atorvastatin

Atorvastatin je v současné době celosvětově nejprodávanějším statinem. Může se kombinovat s pryskyřicemi, fibráty i s ezetimibem. Obvyklá dávka činí 10-20 mg a běžně ji může předepisovat praktický lékař. Dávky 40 mg a 80 mg jsou určeny spíše pacientům se závažnou hyperlipidémií a předepisovány specialisty. Nevýhodou atorvastatinu je minimální vliv na HDL-cholesterol, může jeho hladinu i mírně snižovat (28).

Jako většina statinů je biotransformován izoenzymem 3A4 cytochromu P 450 v játrech a váže se velmi silně na plazmatické bílkoviny. To způsobuje jeho interakce s léčivy inhibujícími izoenzym 3A4 a s léčivy, které s ním mohou soutěžit o vazbu na proteiny plazmy.



Obr. 11 – Vápenatá sůl atorvastatinu. Převzato z internetových stránek:
<http://lipitor.canadapharmacy.com/>

4.4.2 Simvastatin

Simvastatin si dlouho držel prim v celosvětovém prodeji. Běžná terapeutická dávka je 20-40 mg. Může se užívat jak samostatně, tak společně s ezetimibem nebo pryskyřicí.

4.4.3 Fluvastatin

Fluvastatin je bezpečnější než výše zmíněné statiny, ale bohužel i méně účinný. Sníženého rizika nežádoucích účinků se využívá u pacientů léčených imunosupresivou. Podává se v dávkách 40 mg a 80 mg. Výhodně se kombinuje s fibráty.

4.4.4 Rosuvastatin

Nejúčinnějším statinem je rosuvastatin, jeho nevýhodou je však vysoká cena a menší množství intervenčních studií. Má komplexní účinky na lipidové spektrum a kromě snižování hodnoty LDL-cholesterolu zvyšuje i hladinu protektivního HDL-cholesterolu.

4.4.5 Pravastatin, Lovastatin, Pitavastatin

Zatímco pravastatin a lovastatin jsou starší léčiva a v dnešní době jsou nahrazovány novějšími, pitavastatin je obdobou rosuvastatinu a zatím se ještě ve větší míře nepoužívá.

5. EXPERIMENTÁLNÍ MODELÝ ATROSKLERÓZY

Vzhledem k potřebě co nejlepšího objasnění aterosklerotického procesu a vyhledání té nejúčinnější léčby, nabral výzkum tohoto onemocnění v poslední době na obrovské síle. Stejně jako u jiných chorob, není etické používat v počátečních fázích výzkumu lidský organismus, proto se hledají co nejvhodnější zvířecí modely, které by co nejpřesněji reprezentovaly fyziologické i patologické děje během rozvoje aterosklerózy v lidském těle. První experimentální studie se datují k roku 1908. Tehdy předložil výsledky svého výzkumu Ignatowski, který se zabýval pokusy na králících, ti byli krmeni stravou s vysokým obsahem živočišných proteinů. V intimě jejich aorty pozoroval tvorbu velkých jasných buněk (29).

5.1 Hledání vhodného zvířecího modelu

Za nejvhodnější modely se dosud považovala větší zvířata, která dobře zastupovala fungování lidského těla. Mezi ta nejlepší se řadí prasata, nelidští primáti a králíci. U králíků sice vyvstal problém, protože jejich tělo není samo o sobě schopno spontánně aterosklerózu vyvolat, ale po zkrmování stravou bohatou na cholesterol se u nich začaly tvořit léze v poměrně krátké době. Stejný problém brání používání psů a krys, u těchto zvířat by byla však nutná nadměrná úprava jídelníčku s vysokým obsahem cholesterolu, proto se pro výzkumné záměry nepoužívají. Ne příliš vhodní, ale také někdy používaní byli křečci a holubi (30).

Prasečí model krmený vhodným množstvím cholesterolu má princip rozvoje aterosklerózy, vzniku lézí a koncentraci lipidů v plazmě asi nejbližší člověku. Bohužel většímu využívání velmi dobrých prasečích modelů a modelů nelidských primátů brání především finanční nákladnost, u některých druhů riziko výrazného snižování počtu jedinců nebo i vyhynutí, v neposlední řadě je velkou nevýhodou nedostatek prostoru a dlouhodobá složitá péče.

Do počátku 90. let se výzkum prováděl hlavně na králících, a i když ani tento model nebyl ideální, přinesl již některé zajímavé výsledky. Podíl studií zaměřených na prasata a primáty byl mnohem menší. Prasečí model však i tak dokázal odhalit, že v počáteční fázi aterosklerotického procesu cestují do postižené oblasti monocyty (31). Jiné pokusy na králících a opicích zase objasnily další buněčné události v probíhající tvorbě lézí (32).

5.2 Myší model aterosklerózy

Dlouhá léta se hledal experimentální model, který by měl co nejméně nedostatků a co nejlépe by charakterizoval lidskou aterogenezi. U myšího modelu nejdříve panovalo spousta obav a spíše převažující negativní postoj. Bylo to z důvodu, že většina myší neměla ve svých cévách aterosklerotické pláty, dále se vědci obávali, že myši nepřežijí stravu bohatou na tuky, že vzniklé léze budou příliš malé, nebudou reprodukovatelné, a nebudou odpovídat lézím u lidí (33).

Další otázkou byla míra shody myšího organismu s lidským. Tyto odlišnosti je třeba brát vždy v úvahu. Člověk se dožívá průměrně 75 let, zatímco myš žije obvykle 2 roky. Neméně rozdílná je i hmotnost dospělých jedinců, člověk váží zhruba 70 kg, myš pouze asi 30 g. Odlišnosti jsou poměrně velké i v lipidovém profilu, většina nebezpečného cholesterolu se u lidí váže na LDL, ale u myší převažuje vazba na HDL částice, které jsou v lidském organismu naopak protektivní a rozvoji aterosklerózy brání. Pokud jsou tedy myši krmeny klasickou stravou s nízkým množstvím tuku, ateroskleróza jejich cévy nenapadá.

Velkou výhodou je, že myši jsou v laboratorních podmínkách velmi dobře kontrolovatelné, zkrmované přesně definovanou stravou, což je u dlouhodobých studií na lidech nereálné. V lidské populaci se ale provádí velké množství studií asociačních, které sledují genetický vliv na aterosklerotický rozvoj.

Mezi další výhody užití myšího modelu pro experimentální výzkum patří jejich běžná dostupnost, minimální cena a také jednoduchý chov s malým nárokem na prostory. Období vývinu je krátké, intrauterinní růst trvá přibližně 3 týdny a dalších 6 týdnů myší mládě dospívá do pohlavní zralosti. Za účelem získání co nejlepšího výzkumného druhu se zasahuje do jejich genetické informace. V minulosti již bylo velké množství myších skupin prokříženo a pro zlepšení reprodukovatelnosti lézí se využilo zanesení dědičných vloh, než náhodně narozených jedinců. Vzhledem k tomu je i další možností výzkumu na myších genetické inženýrství včetně různých druhů genetických experimentů (33).

5.2.1 Myší model C57BL/6

Jak již bylo zmíněno výše, myši jsou vůči rozvoji aterosklerózy velice odolné. Z experimentů vyplynulo, že nejlépe se dá aterogeneze indukovat, u kmene myši C57BL/6. Pokud je tento myší druh krměn stravou bohatou na cholesterol obsahující kyselinu cholovou, k rozvoji lézí dochází. Od lidského stavu se ale liší, a to jak lokalizací, tak histologickou povahou. Tento proces se také spíše přisuzuje zánětlivé reakci, než genetické predispozici (34).

Poprvé byl výskyt lézí u myšího modelu C57BL/6 vyvolán ve Wisslerově laboratoři během 60. let 20. století. Tyto druhy byly krmeny speciální stravou, obsahující 30% tuku, 5% cholesterolu a 2 % kyseliny cholové. Bohužel použitá vysokotuková strava byla velmi toxická, myši chřadly a zpravidla umíraly na závažné infekce dýchacích cest. Výzkum se tedy dále zaměřoval na zavedení takové stravy, která by byla pro myši relativně bezpečná. Paigen a další ji výhodně upravili v poměru: 15% tuku, 1,25% cholesterolu a 0,5 % kyseliny cholové. Tato strava byla pojmenována jako „Paigenova dieta“ (35).

Myší model C57BL/6 však vykazoval i mnoho nevýhod. U jedinců starých 4-5 měsíců byla postižená místa velmi malá, o velikosti v rozmezí 200-1000 mikrometrů a nacházela se téměř výhradně v aortálním sinu, kdežto u lidí se pláty vyskytují i v mnoha jiných cévách. Aterosklerotický vývoj u těchto myší také nepokračoval jako u lidí až do

vzniku komplikovaných plátů, ale trval pouze do stádia pěnových buněk a tukových proužků. U stravy podávané při indukci aterogeneze bylo navíc prokázáno, že tato strava samotná vyvolává zánětlivý proces, při kterém dochází k expresi reaktantů akutní fáze, jako je např. sérový amyloid A. Přestože byl tento model hojně využíván, kvůli zmíněným nevýhodám se od něj začalo ustupovat. Jeho hlavním nedostatkem je výrazná odlišnost od lidské aterogeneze (20).

5.2.2 *Myší model apoE/LDLr-DKO*

Výhodou zkoumání na myším modelu je možnost vyřazení nebo nahrazení některých endogenních genů. Toho je využito také u nového modelu apoE/LDLr-DKO (double knockout). Tento myší model se vyznačuje dvojitým vyřazením genů, jedním pro apolipoprotein E a druhým pro LDL receptor. Apolipoprotein E je bílkovina, která se váže na lipoproteinovou částici a zajišťuje její vychytávání z plazmy vazbou na LDL receptor.

U těchto myší dochází k vývoji těžké hyperlipidémie a aterosklerózy, jsou tak dobře navozeny podobné podmínky, jako při poruchách hladin lipoproteinů u lidí (36). Kombinace dvojitého vyřazení se jeví jako výhodná, protože i při normální pravidelné stravě těchto myších modelů byl více zřetelný vývoj aterosklerózy, než u modelů s vyřazeným genem pouze pro apolipoprotein E (37).

6. TRANSFORMUJÍCÍ RŮSTOVÝ FAKTOR BETA A ENDOGLIN

6.1 Transformující růstový faktor beta (TGF- β)

Transformující růstový faktor beta patří do skupiny cytokinů. Má polypeptidovou strukturu a vyznačuje se rozsáhlým množstvím funkcí. Zařazujeme ho do tzv. „superrodiny transformujících růstových faktorů“, což je skupina polypeptidů, které mají podobnou strukturu. Podobají se i regulačním procesy v lidském těle, kde u různých buněk lidského těla ovlivňují jejich migraci, přežívání, proliferaci nebo diferenciaci (38).

Rozlišují se tři izoformy TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 (39).

Různé izoformy se liší jak v místě, kde se exprimují, tak účinkem. Jejich primární struktura je neaktivní, jsou uvolňovány jako prekurzory, které mohou být následně aktivovány reakcí s proteázami nebo trombospodinem. TGF- β 1 je produkován endotelovými buňkami, buňkami pojivových tkání a hematopoetickými buňkami. Této izoformě je připisován vliv na kardiovaskulární systém. TGF- β 2 exprimují buňky epiteliální a neuronální, a poslední TGF- β 3 je exprimován hlavně buňkami mezenchymálními (40).

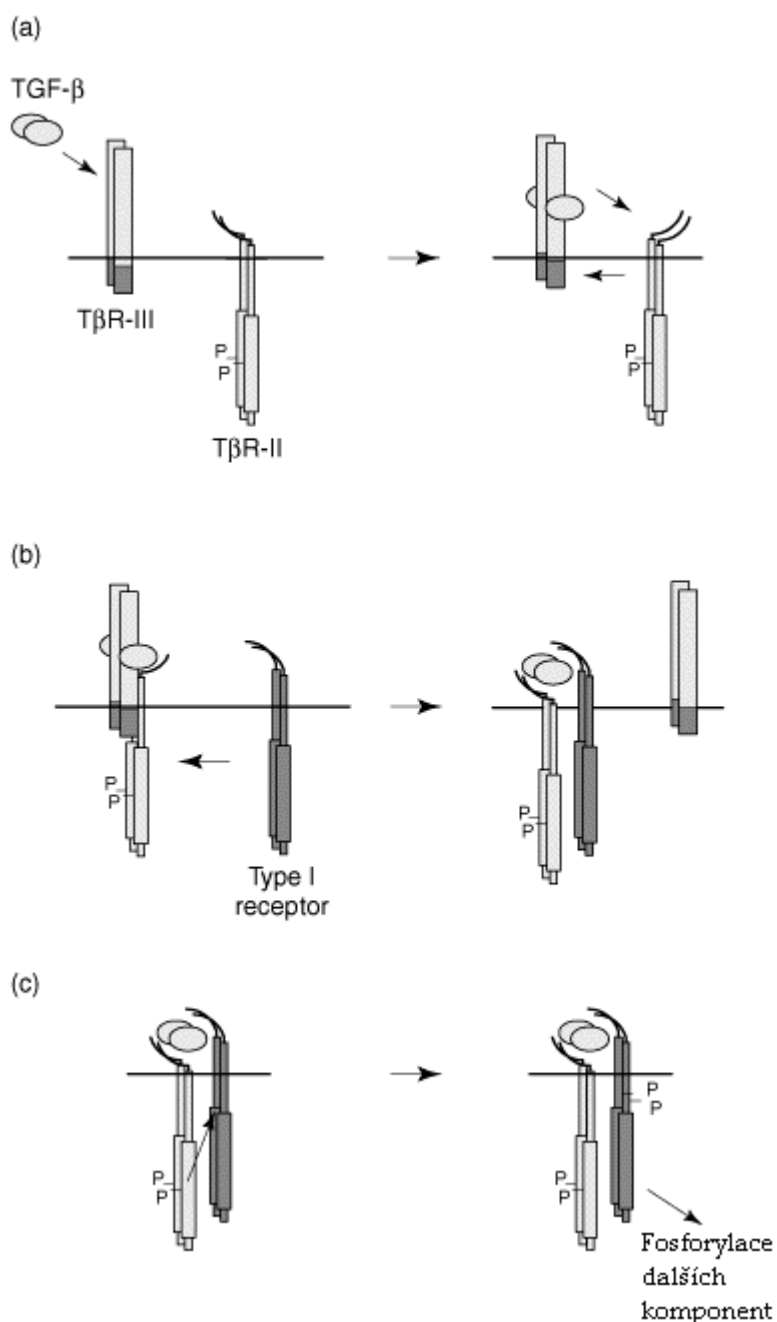
Jak již bylo řečeno, účinky TGF- β jsou multifaktoriální. Najdeme mezi nimi jak procesy lidskému tělu prospěšné, tak i patologické. Experimentálními studiemi byla prokázána při dostatečné expresi TGF- β zvýšená stabilita aterosklerotických plátů a pozitivní korelace mezi aktivitou TGF- β a regresí lézí (41). Dále se TGF- β podílí na zvýšené tvorbě extracelulární matrix s účastí hladkosvalových buněk. To ukazuje na protektivní vliv při aterogenezi a vysvětluje se protizánětlivým působením. Samozřejmě s ohledem na to, že se ateroskleróza v dnešní době za zánětlivý proces považuje (42).

V dalších studiích se naopak zjišťovalo, jak se bude organizmus chovat při zablokování TGF- β 1. Protektivní vliv tohoto cytokinu byl výsledky podpořen, protože jeho blokáda podněcovala rozvoj nestabilních aterosklerotických plátů, se silnou zánětlivou reakcí (43).

Za účelem zjištění podpory aktivace či inhibice TGF- β 1 bylo důležité prozkoumat, které molekuly ovlivňují jeho expresi. Bylo zjištěno, že pozitivní aktivitu vykazují hlavně apolipoprotein A, lipoprotein A, PAI-1 a plasmin (44).

Některé výsledky experimentálních studií však protektivní účinek TGF- β 1 vyvracejí. Jedná se především o působení v iniciační fázi aterosklerózy. Při tvorbě časných plátů se v postiženém místě cévní stěny kumulují makrofágy, hladké svalové buňky a T-lymfocyty, u kterých se prokázala vysoká exprese TGF- β 1, ten by se tak tedy mohl také podílet na rozvoji aterogeneze (45). Mechanismus tohoto efektu není zcela znám, ale uvažuje se, že by TGF- β 1 mohl chemotaxí přitahovat leukocyty, které sekundárně přitahují další makrofágy, podílející se na ukládání lipidů do intimy (46).

TGF- β 1 působí v různých fázích aterogeneze odlišně. Ukázalo se, že tvorba extracelulární matrix stimulací hladkosvalových buněk pomocí TGF- β 1 probíhá pouze v pokročilých lézích a přispívá tak ke stabilizaci plátu (46).



Obr. 12 - Mechanismus aktivace TGF- β receptorů. Je vyobrazen současný model pro transmembrální signalizování TGF- β skrz komplex receptorů TGF β . (a) TGF- β se úvodně váže na TGF- β RIII, což usnadňuje vazbu na TGF- β RII. (b) Následně TGF- β zabudovaný do TGF- β RII navazuje TGF- β RI do složitěho komplexu. (c) TGF- β RI je poté fosforylován pomocí konstitutivně aktivní kinázy. Aktivovaný TGF- β RI následně propaguje signál pomocí fosforylace dalších cílů, včetně smad 2 a smad 3. Převzato z internetových stránek: <http://apresslp.gvpi.net/apcyto/lpext.dll/Receptor/lis18c005/lis18c005hfig?fn=document-frame.htm&f=templates&2.0>

6.2 Endoglin

Účinky TGF- β jsou zprostředkovány vazbou na receptory, které nesou označení: TGF- β RI, TGF- β RII, TGF- β RIII. TGF- β RIII dostal jméno endoglin. Tím se tedy endoglin podílí i na účinku TGF- β 1. Endoglin je protein tvořený 658 aminokyselinami a označuje se také CD105. Jeho součástí je krátká intracelulární doména a jedna transmembránová jednotka (47).

Endoglin je nepostradatelný pro spoustu životních funkcí. Mezi hlavní účinky patří vliv na normální vaskulogenezi a angiogenezi. Při experimentech na myších, kterým byla záměrně „vypnuta“ produkce endoglinu, docházelo k jejich úhynu již v děloze, nejčastěji kolem 9. dne embryonálního vývoje. Studování příčin prokázalo, že smrt u těchto myších modelůavinily především závažné poruchy při tvorbě cévního systému. Endoglin je důležitý i v procesu erytropoézy. Migraci a proliferaci endoteliálních buněk také podporuje dostatečné množství endoglinu, a to aktivací signální kaskády (48).

Přirozená exprese endoglinu byla prokázána v kostní dřeni dospělého člověka u hematopoetických kmenových buněk, u monocytů, v syncytiotrofoblastu placenty a v endotelu, pro aterogenezi nejzásadnějším. Endoglin se projevuje převážně při angiogenezi, během zánětlivé reakce, podporuje růst nádorů, a účastní se i hojícího procesu (49-51).

Molekula endoglinu se exprimuje ve dvou různých izoformách. Jejich rozdíl je v intracelulární části, kde se liší počtem aminokyselin. Označují se jako izoforma S (short) a izoforma L (long). Zajímavý je protikladný účinek izoform na nádorové bujení. Zatímco S izoforma progresi nádoru brzdí, L izoforma naopak podporuje novotvorbu cév a tím i nádorový růst. Nejen struktura a účinek, ale i místo exprese izoform endoglinu je odlišné. Short izoforma je exprimována v játrech a plicích, long izoforma buňkami endotelu (52).

Endoglin není závislý pouze na TGF- β signální kaskádě, bylo prokázáno, že dokáže fungovat i zcela samostatně. Při zapojení do TGF- β signální kaskády dokáže kromě TGF- β 1 a TGF- β 3 interagovat i s receptory TGF- β RI a TGF- β RII, které ho můžou naopak také aktivovat (53).

Role endoglinu v patologických procesech je různá. Při ateroskleróze dochází v aterosklerotických plátech ke zvýšené expresi endoglinu, přičemž v nepostížených cévách je exprese minimální. Dalšími proteiny, které se společně s ním exprimují v plátech jsou TGF- β RI a TGF- β RII (54). Bylo prokázáno, že koncentrace endoglinu a eNOS, která má vasodilatační účinek, jsou ve vzájemném vztahu. Je však i možné, že endoglin stimuluje expresi eNOS přímo (53).

Mutací genu pro vznik endoglinu je způsoben rozvoj autozomálně dominantního onemocnění – hereditární hemorhagické teleangiektázie. Vztah mezi pozměněním genu a projevy této choroby byl dobře popsán. Struktura cév, a to především kapilár, je zejména v játrech, plicích a mozku poškozena. U artérií a vén může docházet také k malformacím (47).

Endoglin se podílí na angiogenezi, proto se sledoval i jeho vztah k neoplaziím. Bylo pozorováno, že je ve větším množství exprimován např. u nádoru prsu či prostaty (55).

7. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit a popsat expresi endoglinu v aterosklerotických plátech u apoE/LDL-receptor deficientních myší. Dalším úkolem bylo kvantifikovat endoteliální expresi endoglinu v kořenu aorty po podání atorvastatinu.

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru, vážící 15-20 gramů, byly zakoupeny v Jackson Laboratories (USA) a ustájeny ve zvěřinci Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

8.1 Zvířata a předepsaná dieta

U všech myší byl zahájen výkrm experimentálními dietami ve věku 8 týdnů. Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin. Kontrolní, které byla podávána pouze aterogenní dieta a atorvastatinové, které byla podávána aterogenní dieta obohacena o 100 mg atorvastatinu na 1kg váhy denně.

Aterogenní dieta (Western type diet) obsahovala 21 % tuku (11 % nasycených mastných kyselin) a 0,15 % cholesterolu.

Obě skupiny byly krmeny experimentálními dietami po dobu 8 týdnů. Každá z myší byla chována v samostatné kleci. Dostávaly denně 6 g potravy (ve speciálně upravených granulích) a měly volný přístup k vodě po celou dobu studie. Během experimentu nebyly nalezeny změny tělesné hmotnosti v souvislosti se spotřebou potravy.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vyláčněna a bylo provedeno usmrcení předávkováním v parách éteru. Zvířatům byly odebrány ze srdce vzorky krve pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty tkáně tvořené aortou spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C.

8.2 Biochemická analýza

Biochemická analýza vzorků krve byla provedena na gerontologické a metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm, triglyceridy při 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

8.3 Imunohistochemie

Veškerá imunohistochemická barvení byla provedena na cévách získaných z geneticky modifikovaného kmene myši. Jednalo se o samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru vážící 15-20 gramů.

Odebrané segmenty tkáně tvořila aorta spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty byly ponořeny do zmrazovacího média (tissue freezing medium) (*Leica, Praha, Česká republika*), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C. Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm na zmrazovacím mikrotomu.

Pro detekci exprese endoglinu byla použita metodika Avidin-Biotin metodika (ABC) s detekcí pomocí DAB, který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci.

Primární protilátky

K detekci exprese markeru endoglinu v cévní stěně byla použita pro světelnou mikroskopii monoklonální protilátka rat anti-mouse endoglin ve zředění 1/100 (*Pharmingen, USA*).

Detekční systémy

K vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu byl použitý diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, *DAKO, Carpinteria, USA*).

Fotodokumentace a digitalizace snímků z fluorescenčního mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (*Vitana Corp., USA*) za pomoci softwaru NIS (*Laboratory Imaging Prague, Česká republika*).

Pracovní postup

ABC metodika – detekce exprese endoglinu

sušení tkáňových řezů v termostatu (60 min)

fixace v acetonu (-20°C; 30 min)

oschnutí řezů (15 min)

- | | |
|---|-----------------|
| 1. PBS | 5 minut |
| 2. 10% serum v PBS (900 µl PBS + 100 µl sera) | 30 minut |
| 3. inkubace s anti-avidinem | 15 min |
| 4. PBS | 2x5 min |
| 5. inkubace s anti-biotinem | 15 min |
| 6. PBS | oplach |
| 7. primární protilátka (ředí s v BSA) | 60 minut |
| 8. PBS | 2x5 min |
| 9. 10% serum v PBS (900 µl PBS + 100 µl sera) | 15 minut |
| 10. sekundární protilátka (ředí se v BSA + 2% mouse serum) | 30 minut |
| 11. PBS | 5 minut |
| 12. 3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml PBS) | 15 minut |
| 13. PBS | 2x5 minut |
| 14. ABC komplex elite | 30 minut |
| (10 µl A + 10 µl B do 500 µl PBS nechat stát (30 minut)) | |
| 15. PBS | 2x5 minut |
| 16. DAB (10 µl DAB in 500 µl buffer) | 30 sekund |
| 17. Destilovaná voda | |
| 18. Hematoxylin | 5 sekund |

19. Modráání pod tekoucí vodou z kohoutku	1 minuta
20. aceton	oplach
21. aceton-xylen (10:1) (vždy dělat znova)→ aceton-xylen (1:10)	3 minuty
22. 3x xylen	2 minuty

8.4 Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí

Plocha endoteliální exprese endoglinu byla kvantifikována pomocí stereologických metod (56). Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7 μ m (0,385 mm dlouhé úseky cévy tvořící tzv. referenční objem). Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé barvení byl vybrán náhodně a pak se vybral každý 5. řez, takže pět řezů pro každé barvení bylo použito ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 100 průsečíků mezi body sítě a pozitivitou endoteliálním barvením (endoglin) na jednu cévu (57). Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočetla podle vzorce:

$$\text{estA} = a * P,$$

kde parametr **a** charakterizuje plochu příslušející jednomu testovacímu bodu a **P** je počet průsečíků mezi body testovací sítě a pozitivitou barvení.

Fotodokumentace a digitalizace z mikroskopu byla provedena mikroskopem Nikon Eclipse E2000, digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA) a za pomoci softwaru LUCIA verze 5.0 (Laboratory Imaging Prague, Česká republika). Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

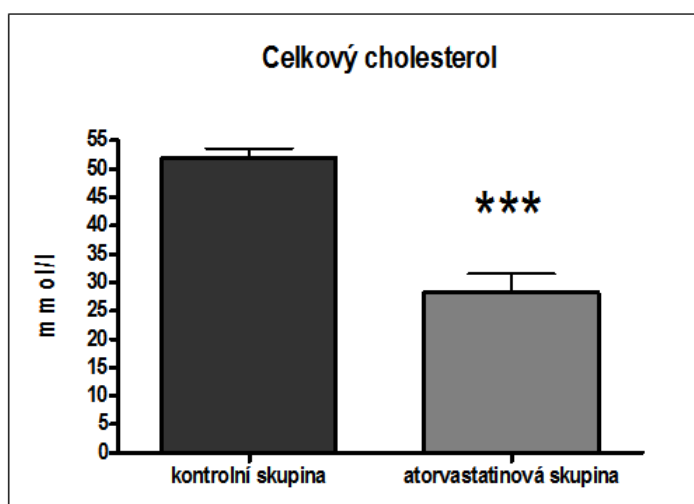
8.5 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat byl použit neparametrický T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$.

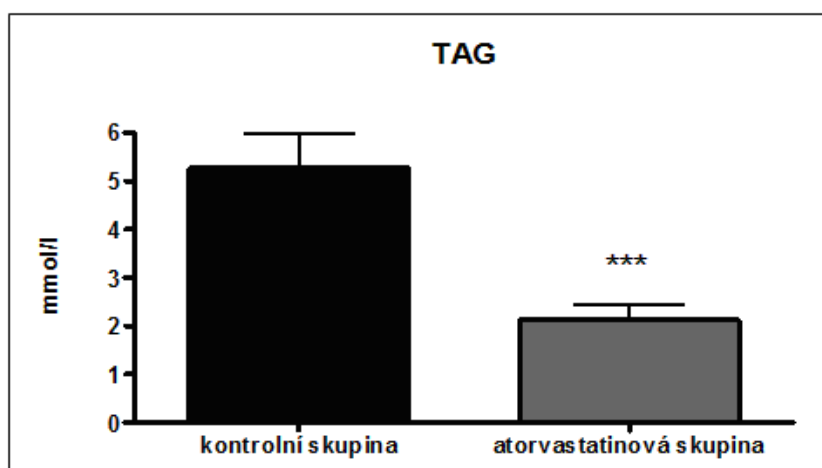
9. VÝSLEDKY

9.1 Biochemická analýza

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu a triacylglycerolů (TAG). Výsledky prokázaly, že osmitýdenní podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg statisticky významně snížilo hladiny obou parametrů, tedy hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou ($***P \leq 0,001$) a hladiny triacylglycerolů ve srovnání s kontrolní skupinou ($***P \leq 0,001$) (viz. graf 1 a 2).



Graf. 1 – Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší

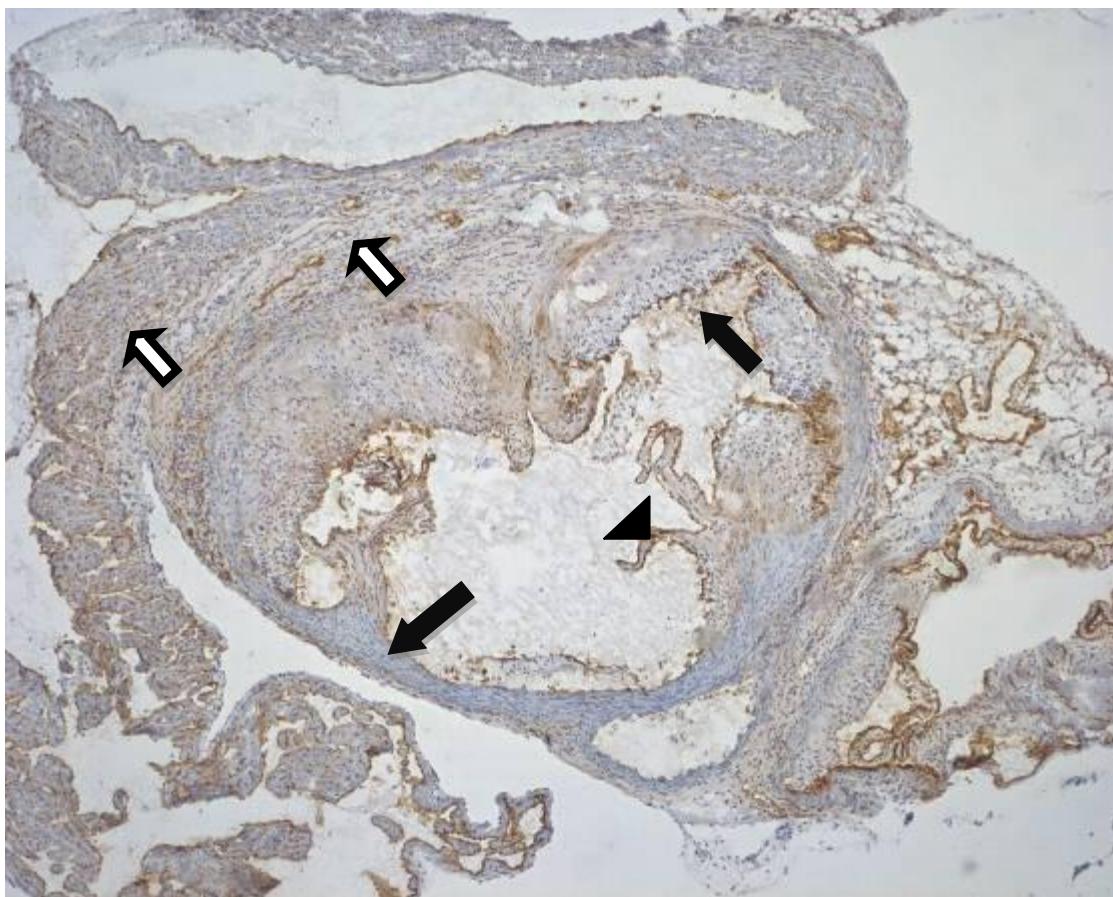


Graf. 2 – Hladiny triacylglycerolů u experimentálních myši

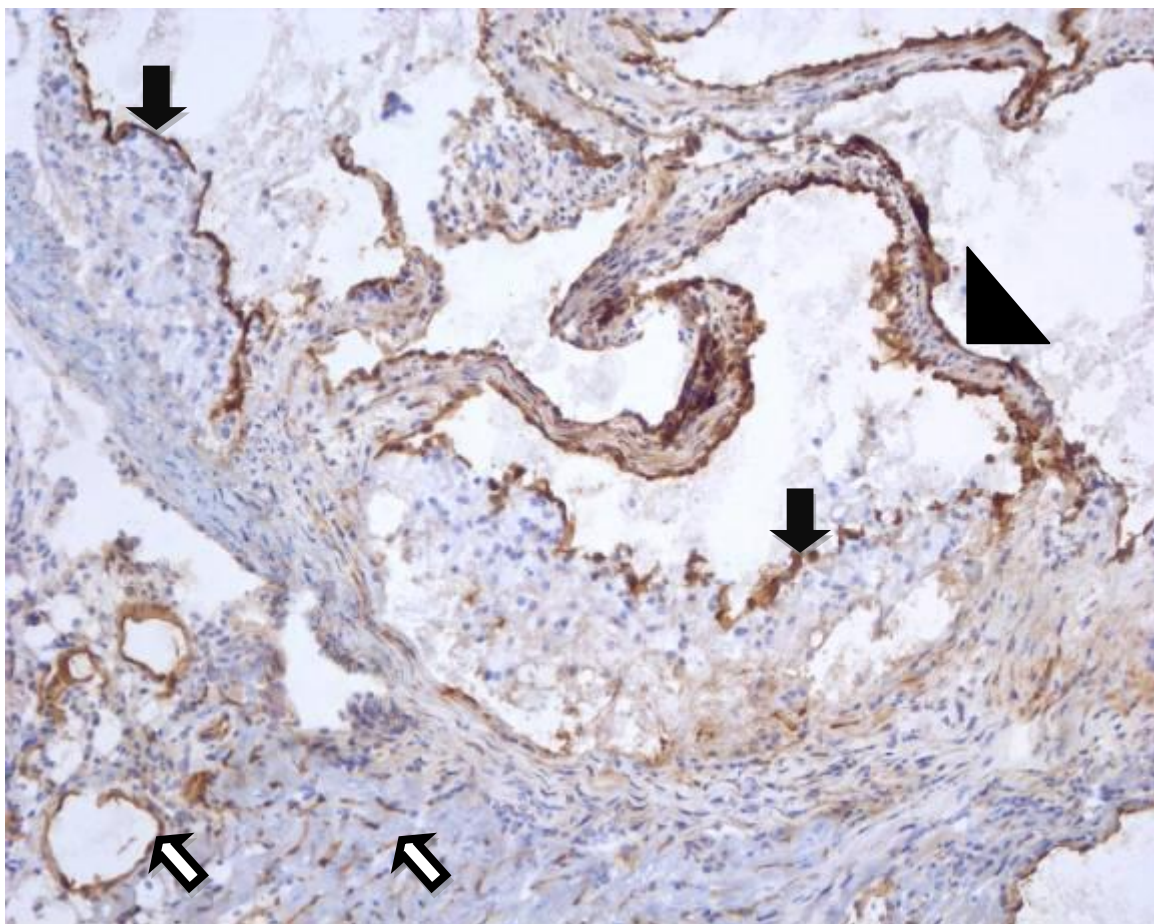
9.2 Imunohistochemická analýza

Imunohistochemické barvení endoglinu v oblasti aortálního sinu

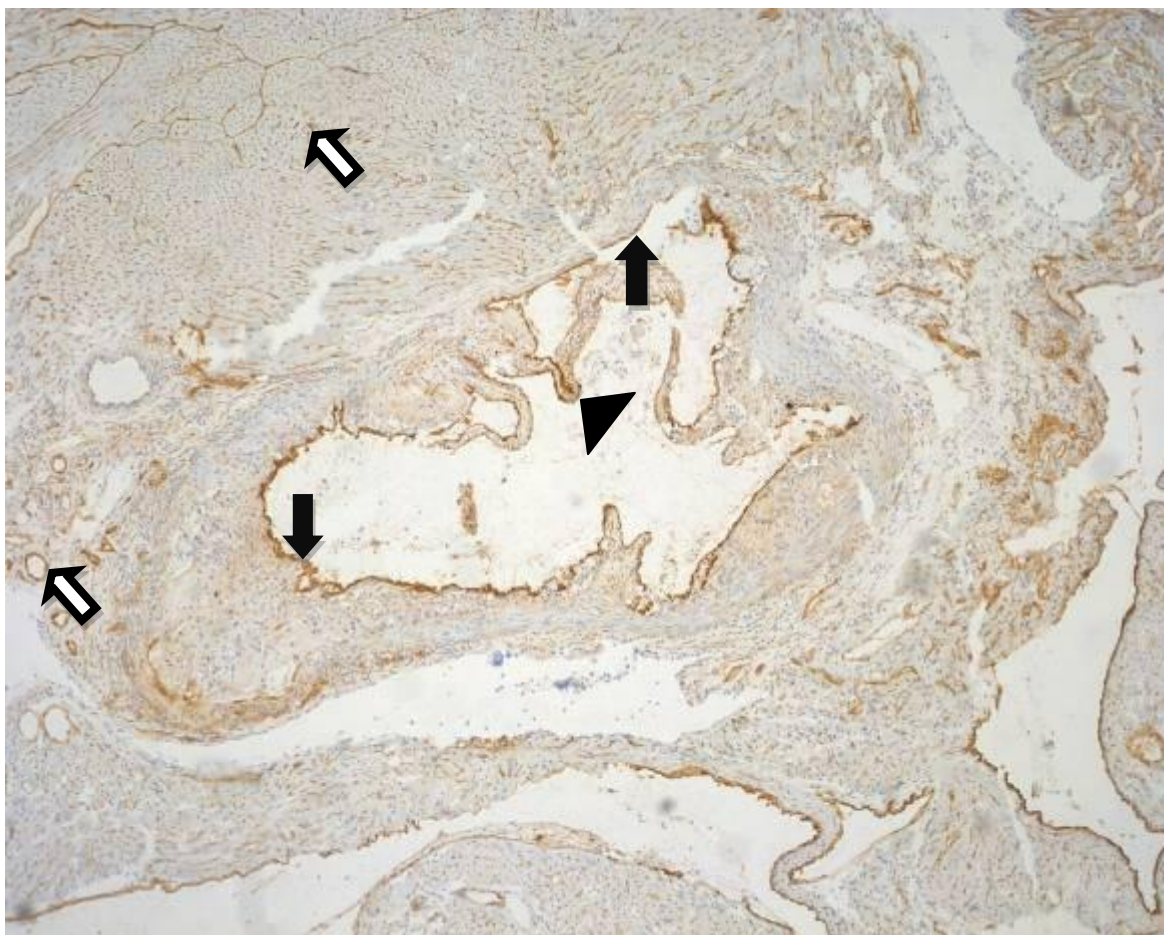
Imunohistochemická analýza prokázala expresi endoglinu v obou experimentálních skupinách (viz obr. 13 a 15). V obou skupinách byla pozorována exprese endoglinu v kapilárách a drobných cévách myokardu. Z hlediska cévy byl endoglin exprimován cévním endotelem na povrchu aterosklerotických plátů. Exprese byla také pozorována mimo pláty a to opět cévním endotelem. Výrazná exprese endoglinu byla také pozorována na endotelu semilunárních chlopní. Naopak téměř žádná či velmi nepatrná exprese byla detekována v aterosklerotických lézích. Obecně z výsledků barvení vyplynulo, že endoglin byl exprimován podobným způsobem u kontrolní i atorvastatinové skupiny. Nicméně intenzita endoteliální exprese byla u atorvastatinové skupiny vyšší.



Obr. 13 – Imunohistochemické barvení endoglinu u kontrolní skupiny. Exprese endoglinu byla pozorována na cévním endotelu plátů, mimo léze (šipky), v kapilárách a drobných cévách myokardu (bílé šipky) a v neposlední řadě na semilunárních chlopních (hrot šipky). Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem, zvětšeno 100x.



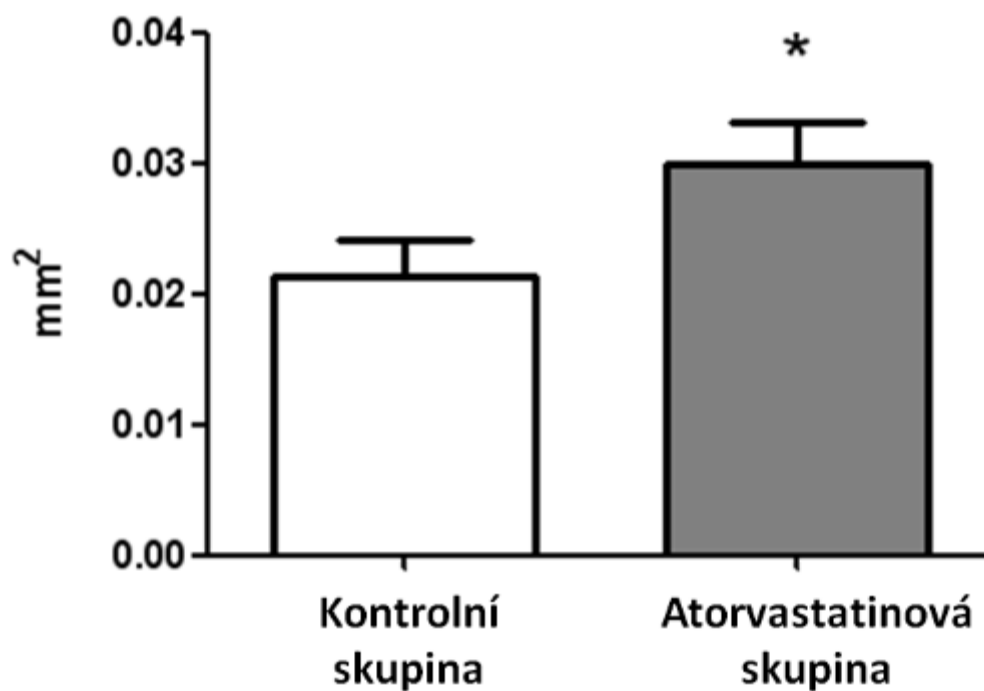
Obr. 14 – Detail imunohistochemického barvení endoglinu u kontrolní skupiny. Expres endoglinu byla pozorována na cévním endotelu plátů (šípky), v kapilárách a drobných cévách myokardu (bílé šípky) a v poslední řadě na semilunárních chlopních (hrot šípky). Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem, zvětšeno 200x.



Obr. 15 – Imunohistochemické barvení endoglinu u atorvastatinové skupiny. Expze endoglinu byla pozorována na cévním endotelu plátů, mimo léze (šipky), v kapilárách a drobných cévách myokardu (bílé šipky) a v neposlední řadě na semilunárních chlopních (hrot šipky). Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem, zvětšeno 100x.

9.3 Stereologická analýza endoteliální expze endoglinu

Použití stereologických metod konkrétně metody systematického nestranného náhodného výběru a bodových testovacích mříží nám umožnilo kvantifikovat selektivně pouze pozitivitu na barvení na endoglin na cévním endotelu aorty (viz obr. 16).



Obr. 16 – Stereologická analýza endoteliální exprese endoglinu v oblasti aortálního kořene. Podávání atorvastatinu vedlo ke statisticky významnému zvýšení exprese endoglinu v porovnání s kontrolní skupinou ($p < 0.05$).*

10. DISKUZE

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným onemocněním, které určitým způsobem postihuje všechny věkové skupiny obyvatelstva. Klinické příznaky aterosklerózy, které se ve většině případů objevují až v pozdějších letech života, jsou dnes velmi frekventované a ateroskleróza je v současné době příčinou téměř 50% všech úmrtí. Rozsáhlý výzkum v oblasti aterosklerózy odhalil v posledních letech řadu nových poznatků, které přispívají k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze (58). Ateroskleróza postihuje zejména arterie elastického a muskulárního typu, přičemž u člověka jsou to zejména koronární arterie a abdominální aorta. Mezi nejzávažnější projevy aterosklerózy patří ischemická choroba srdeční (ICHS). Rozsah postižení závisí na velikosti a průměru zasažené cévy. Pokud dojde pouze k chvilkovému nedokrvení, pacient pocítuje většinou výrazný tlak na hrudi a dušnost. Tento stav se označuje angina pectoris, je přechodný a po podání vazodilatujícího nitroglycerinu nebo po zklidnění příznaky vymizí. Pokud je však plát nestabilní, může dojít k jeho ruptuře, tvorbě trombu a výraznému zúžení nebo úplnému uzavření lumen cévy. Nezásobená tkáň se hojí jizvou, stává se nefunkční a snižuje tak srdeční výkonnost. Zde se jedná o infarkt myokardu (IM), který bez včasného zásahu lékařů může vést ke smrti pacienta (59).

V terapii hyperlipidemií a cévních komplikací (aterosklerózy, ICHS) jsou dnes asi nejvýznamnějšími léky statiny. Statiny jsou v současné době považovány za nejúčinnější hypolipidemika. Jsou to kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu - 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-koenzymA-reduktázy (HMG-CoA reduktázy) (60). Pokud buňka zaznamená sníženou syntézu cholesterolu, dojde ke zvýšené expresi LDL receptorů na buněčné membráně hepatocytů, ale i na buňkách dalších orgánů. Díky tomu se lipoproteinové částice s nízkou hustotou vychytávají z krevního oběhu rychleji a účinněji se odbourávají. Statiny jsou obecně velmi účinné ve snižování cholesterolu (zejména LDL) u lidí. U zvířat a zejména myši existují pouze některé modely, které reagují na statiny stejně jako v humánní medicíně. Mezi tento model patří také apoE/LDLr-deficientní myši (37).

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myši za účelem zavedení nového zvířecího modelu. Myši jsou obvykle vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Při příjmu běžné stravy mají nízkou hladinu celkového cholesterolu a vyšší hladinu protektivního HDL cholesterolu, tudíž se u nich nevyvíjejí aterosklerotické léze. Ovšem pokud jsou myši krmeny stravou s vysokým podílem cholesterolu a tuků, která též obsahuje žlučové kyseliny, hladina jejich celkového cholesterolu roste a po několika měsících se u vybraných kmenů myši začnou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu (20). Velkou výhodou je, že myši jsou v laboratorních podmínkách velmi dobře kontrolovatelné, zkrmované přesně definovanou stravou, což je u dlouhodobých studií na lidech nereálné. V lidské populaci se ale provádí velké množství studií asociačních, které sledují genetický vliv na aterosklerotický rozvoj. Jak již bylo zmíněno výše, myši jsou vůči rozvoji aterosklerózy velice odolné, z experimentů vyplynulo, že nejlépe se dá aterogeneze indukovat, u kmene myši C57BL/6. Pokud je tento myši druh krmen stravou bohatou na cholesterol obsahující kyselinu cholovou, k rozvoji lézí dochází. Od lidského stavu se ale liší, a to jak lokalizací, tak histologickou povahou. Tento proces se také spíše přisuzuje zánětlivé reakci, než genetické predispozici (34).

V roce 1992 použily dvě laboratoře speciální genovou technologii, která přinesla myši deficientní v genu pro apolipoprotein E (apoE) (61).

My jsme v naší diplomové práci použili ApoE/LDL receptor deficientní myši, které vyvíjí výraznou spontánní hypercholesterolemii a aterosklerotické léze již v pátém týdnu svého života. V osmém týdnu, již mají pokročilé léze v oblasti aortálního sinu, jejichž vývoj lze samozřejmě ještě urychlit podáváním aterogenní diety. Z tohoto důvodu je tento model považován za velmi dobrý zvířecí model pro studium hypolipidemik (62).

Cílem této diplomové práce bylo navázat na předchozí práci Mgr. Stráského s ohledem na studium exprese endoglinu po podávání atorvastatinu.

Endoglin nebo také TGF- β RIII je schopen ovlivňovat činnost TGF- β , což je cytokin, který má v procesu aterosklerózy zřejmě protektivní účinky (63). Endoglin je protein tvořený 658 aminokyselinami a označuje se také CD105. Jeho součástí je krátká intracelulární doména a jedna transmembránová jednotka (47). Endoglin je nepostradatelný pro spoustu životních funkcí. Mezi hlavní účinky patří vliv na normální vaskulogenezi a

angiogenezi. Endoglin je důležitý i v procesu erytropoézy. Migraci a proliferaci endoteliálních buněk také podporuje dostatečné množství endoglinu, a to aktivací signální kaskády (48).

V minulé diplomové práci kolegy Stráského se zjistilo, že exprese endoglinu je po podání atorvastatinu zvýšena za současného hypolipidemického účinku. V této práci však byla exprese endoglinu kvantifikována ve stěně celé cévy pomocí metodiky western blot. Vzhledem k tomu, že endoglin je exprimován hlavně endoteliálními buňkami, rozhodli jsme se jeho expresi pospat detailněji a kvantifikovat jeho expresi pouze endoteliálními buňkami v aortálním sinu. Výsledky imunohistochemické analýzy prokázaly expresi endoglinu zejména u endoteliálních buněk a to v myokardu, srdečních semilunárních chlopních, ale zejména také na povrchu aterosklerotických plátů. Na rozdíl od studií z humánní medicíny jsme nenalezli výraznou expresi endoglinu uvnitř plátů a v medii, kde byla jeho exprese potvrzena v hladkých svalových buňkách lidských a prasečích koronárních arteriích (54, 64).

Výsledky stereologické analýzy navíc prokázaly statisticky významné zvýšení endoteliální exprese endoglinu po podání atorvastatinu, což je v souladu s předcházejícími výsledky western blot analýzy. Tyto výsledky mají svůj význam zejména v kontextu literárních údajů, které ukazují na pozitivní vliv exprese endoglinu na expresi zásadního enzymu cévní homeostázy, což je eNOS (53, 65).

Tyto výsledky naznačují, že endoglin může být potenciálním cílem/markerem účinku atorvastatinu a zároveň by mohl mít vliv na vlastnosti cévního endotelu v průběhu aterogeneze.

Tento výsledek napomáhá dalšímu posunu výzkumu na Katedře lékařských a biologických věd, jejímž cílem je popsat expresi a hlavně význam endoglinu v aterogenezi.

11. ZÁVĚR

Výsledky této diplomové práce prokázaly expresi endoglinu, zejména v cévním endotelu u endoteliálních buněk a to v myokardu, srdečních semilunárních chlopních, ale zejména také na povrchu aterosklerotických plátů u apoE/LDLR deficientního myšího modelu aterosklerózy.

Podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg/den vedlo k výraznému hypolipidemickému efektu.

Stereologická analýza imunohistochemického barvení prokázala zvýšenou endoteliální expresi endoglinu po podávání atorvastatinu.

Tyto výsledky naznačují, že endoglin může být potenciálním cílem/markerem účinku atorvastatinu a zároveň by mohl mít vliv na vlastnosti cévního endotelu v průběhu aterogeneze.

12. LITERATURA

1. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-26, 1999.
2. Klika: Histologie. Praha, 1986.
3. Dvorak M: Histologie pro posluchače lékařské fakulty. Brno, 1984.
4. Bjorkbacka H: Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 19: 548-9, 2008.
5. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H and Yokode M: Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 947: 199-205; discussion 205-6, 2001.
6. Shantaram V: Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. *Clin Exp Hypertens* 21: 69-77, 1999.
7. Chan DC, Barrett HP and Watts GF: Dyslipidemia in visceral obesity: mechanisms, implications, and therapy. *Am J Cardiovasc Drugs* 4: 227-46, 2004.
8. Laurila A, Bloigu A, Nayha S, Hassi J, Leinonen M and Saikku P: Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2910-3, 1997.
9. VanderLaan PA, Reardon CA and Getz GS: Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 12-22, 2004.
10. Davignon J and Ganz P: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109: III27-32, 2004.
11. Stehbens WE: The fatigue hypothesis of plaque rupture and atherosclerosis. *Med Hypotheses* 58: 359-60, 2002.
12. Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD and Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1512-31, 1995.
13. Sary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD and Wissler RW: A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on

Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 14: 840-56, 1994.

14. Hallan S, de Mutsert R, Carlsen S, Dekker FW, Aasarod K and Holmen J: Obesity, smoking, and physical inactivity as risk factors for CKD: are men more vulnerable? *Am J Kidney Dis* 47: 396-405, 2006.
15. Pedraza A: [Hyperlipoproteinemia in the production of atherosclerosis. Risk factors: diagnosis and treatment]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 51: 21-33, 1993.
16. McGill HC, Jr., McMahan CA, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE and Strong JP: Effects of nonlipid risk factors on atherosclerosis in youth with a favorable lipoprotein profile. *Circulation* 103: 1546-50, 2001.
17. Catena C, Novello M, Lapenna R, Baroselli S, Colussi G, Nadalini E, Favret G, Cavarape A, Soardo G and Sechi LA: New risk factors for atherosclerosis in hypertension: focus on the prothrombotic state and lipoprotein(a). *J Hypertens* 23: 1617-31, 2005.
18. D'Agostino RB, Jr., Hamman RF, Karter AJ, Mykkanen L, Wagenknecht LE and Haffner SM: Cardiovascular disease risk factors predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes Care* 27: 2234-40, 2004.
19. Davidson MH and Robinson JG: Safety of aggressive lipid management. *J Am Coll Cardiol* 49: 1753-62, 2007.
20. Paigen B, Holmes PA, Mitchell D and Albee D: Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. *Atherosclerosis* 64: 215-21, 1987.
21. Kapur NK and Musunuru K: Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag* 4: 341-53, 2008.
22. Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Miana M, de las Heras N, Cachofeiro V and Luno J: Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem* 14: 243-8, 2007.
23. Calabro P and Yeh ET: The pleiotropic effects of statins. *Curr Opin Cardiol* 20: 541-546, 2005.
24. Borges JL: [Drug combinations: statins and niacin]. *Arq Bras Cardiol* 85 Suppl 5: 36-41, 2005.
25. Wierzbicki AS, Poston R and Ferro A: The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther* 99: 95-112, 2003.

26. Arnaud C and Mach F: Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation. *Arch Mal Coeur Vaiss* 98: 661-6, 2005.
27. Auer J, Berent R, Weber T and Eber B: Clinical significance of pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *Curr Med Chem* 9: 1831-50, 2002.
28. Comparato C, Altana C, Bellosta S, Baetta R, Paoletti R and Corsini A: Clinically relevant pleiotropic effects of statins: drug properties or effects of profound cholesterol reduction? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 11: 328-43, 2001.
29. Yanni AE: The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab Anim* 38: 246-56, 2004.
30. Drobnik J, Dabrowski R, Szczepanowska A, Giernat L and Lorenc J: Response of aorta connective tissue matrix to injury caused by vassopressin-induced hypertension or hypercholesterolemia. *J Physiol Pharmacol* 51: 521-33, 2000.
31. Gerrity RG: The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 103: 181-90, 1981.
32. Faggiotto A, Ross R and Harker L: Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 4: 323-40, 1984.
33. Jawien J, Nastalek P and Korbut R: Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55: 503-17, 2004.
34. Daugherty A: Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci* 323: 3-10, 2002.
35. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D and Williams RA: Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 68: 231-40, 1987.
36. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG and Faraci FM: Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2333-40, 1997.
37. Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, Pospechova K, Solichova D, Andrys C, Zdansky P, Micuda S and Semecky V: Atorvastatin has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in apoE/LDL receptor-double-knockout mice. *Life Sci* 82: 708-17, 2008.
38. Chen CL, Liu IH, Fliesler SJ, Han X, Huang SS and Huang JS: Cholesterol suppresses cellular TGF-beta responsiveness: implications in atherogenesis. *J Cell Sci* 120: 3509-21, 2007.

39. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P and Ten Dijke P: TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 65: 599-608, 2005.
40. Massague J: TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-91, 1998.
41. Gojova A, Brun V, Esposito B, Cottrez F, Gourdy P, Ardouin P, Tedgui A, Mallat Z and Groux H: Specific abrogation of transforming growth factor-beta signaling in T cells alters atherosclerotic lesion size and composition in mice. *Blood* 102: 4052-8, 2003.
42. Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G and Egido J: TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* 74: 196-206, 2007.
43. Mallat Z and Tedgui A: The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. *Curr Opin Lipidol* 13: 523-9, 2002.
44. Grainger DJ: Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 399-404, 2004.
45. Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P, Dilley R, Krushinsky A, Smirnov V, Tararak E, Condrón M and Kostolias G: Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development. *Circulation* 99: 2883-91, 1999.
46. Bobik A: Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1712-20, 2006.
47. ten Dijke P, Goumans MJ and Pardali E: Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11: 79-89, 2008.
48. van Laake LW, van den Driesche S, Post S, Feijen A, Jansen MA, Driessens MH, Mager JJ, Snijder RJ, Westermann CJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, ten Dijke P, Arthur HM, Goumans MJ, Lebrin F and Mummery CL: Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair. *Circulation* 114: 2288-97, 2006.
49. Obreo J, Diez-Marques L, Lamas S, Duwell A, Eleno N, Bernabeu C, Pandiella A, Lopez-Novoa JM and Rodriguez-Barbero A: Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem* 14: 301-10, 2004.
50. Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM and ten Dijke P: Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* 23: 4018-28, 2004.
51. Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carron R, Sanz-Rodriguez F, Perez-Barriocanal F, Rodriguez-Barbero A, Bernabeu C and Lopez-Novoa JM: Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *Faseb J* 18: 609-11, 2004.

52. Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodriguez-Barbero A, Perez-Gomez E, Quintanilla M, Lopez-Novoa JM and Bernabeu C: S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res* 103: 1383-92, 2008.
53. Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L and Bernabeu C: Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 210: 456-68, 2007.
54. Piao M and Tokunaga O: Significant expression of endoglin (CD105), TGFbeta-1 and TGFbeta R-2 in the atherosclerotic aorta: an immunohistological study. *J Atheroscler Thromb* 13: 82-9, 2006.
55. Nikiteas NI, Tzanakis N, Theodoropoulos G, Atsaves V, Christoni Z, Karakitsos P, Lazaris AC, Papachristodoulou A, Klonaris C and Gazouli M: Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. *Gastric Cancer* 10: 12-7, 2007.
56. Nachtigal P, Semecky V, Kopecky M, Gojova A, Solichova D, Zdansky P and Zadak Z: Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract* 200: 219-29, 2004.
57. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B and et al.: The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 96: 857-81, 1988.
58. Mareckova Z, Heller S and Horky K: [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek* 45: 46-50, 1999.
59. Nilsson J: Regulating protective immunity in atherosclerosis. *Circ Res* 96: 395-7, 2005.
60. Tsiara S, Elisaf M and Mikhailidis DP: Early vascular benefits of statin therapy. *Curr Med Res Opin* 19: 540-56, 2003.
61. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL and Ross R: ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14: 133-40, 1994.
62. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL and Brown MS: The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low

density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4431-5, 1994.

63. Mallat Z, Gojova A, Sauzeau V, Brun V, Silvestre JS, Esposito B, Merval R, Groux H, Loirand G and Tedgui A: Rho-associated protein kinase contributes to early atherosclerotic lesion formation in mice. *Circ Res* 93: 884-8, 2003.

64. Ma X, Labinaz M, Goldstein J, Miller H, Keon WJ, Letarte M and O'Brien E: Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2546-52, 2000.

65. Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, Husain M and Letarte M: A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 96: 684-92, 2005.